



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

04-97189

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE DESORDENES
GENÉTICOS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C120 1/68

71. SOLICITANTE NUGEN, INC.

DOMICILIO MD. ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

74. APODERADO ALICIA LORZGA RICARTE
T.P. 53 215
CD 0160 231.

22. BOGOTÁ, D. C., 29 SEP 2004

PETITORIO



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 04097109 00000000 Folios: 314
Fecha (MM): 2004-09-29 17:01:02
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NRCI 411 PRESENTAR
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: RAVGEN, INC

Dirección: 9241 Rumsey Road, Columbia,
MD 21045, Estados Unidos de América.Nacionalidad o Domicilio: MD, Estados
Unidos de América.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: DHALLAN, Ravinder

Dirección: 8013 Thornley court, Bethesda, MD 20817(US)

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US03/06198Fecha: 28/02/03Publicación Internacional No. WO 03/074723 A 3Fecha: 12/09/03

⑥

Título (54)

"MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE DESÓRDENES GENÉTICOS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C12Q 1/68

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

US

(32) Fecha

01/03/02

11/03/02

08/05/02

(31) Número de Solicitud

60/380,232

10/093,618

60/378,354

⑨

Comprobante de Pago No. 04-74.991Fecha: 22-09-04

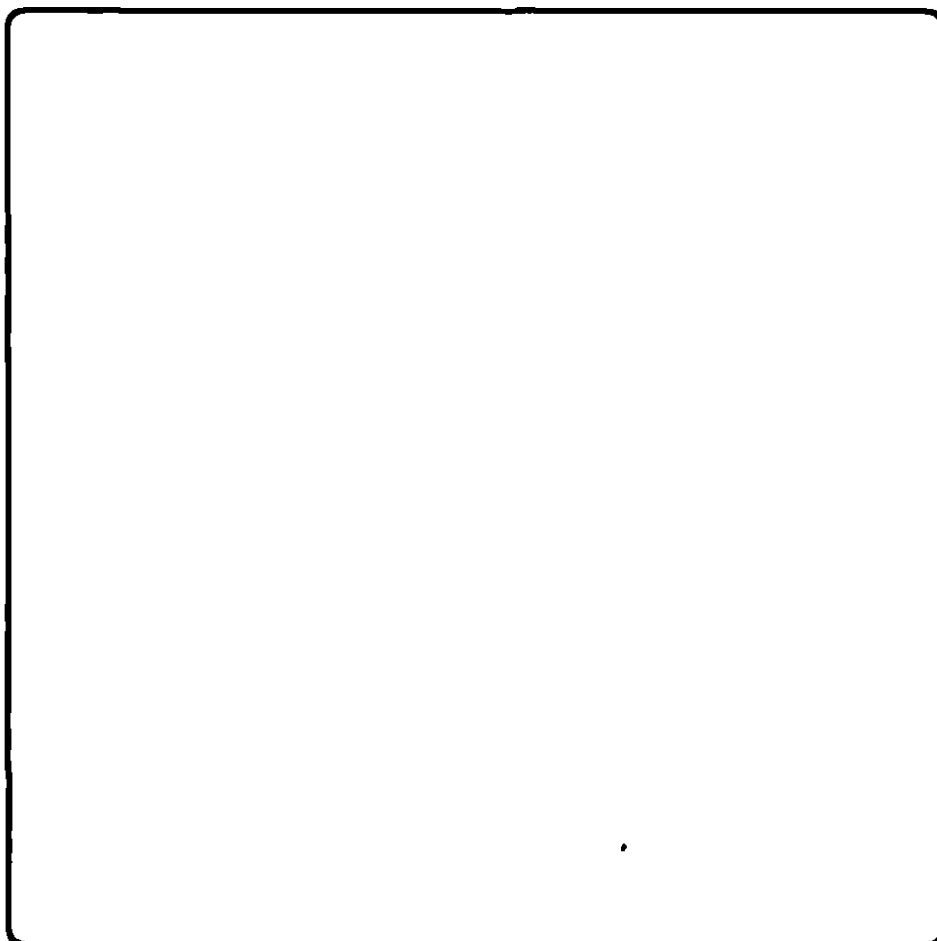
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- ☐ Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Acta Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, notificación del registro de un cambio con su traducción, notificación de recibo de la solicitud por la autoridad competente de examen preliminar Internacional.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: ALICIA LLOREDÁ RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713. T.P. 53.215

2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04097109 00000000 Folios: 314
Fecha (AMD): 2004-09-29 17:01:02
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2026 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 74,991
FECHA : SEPTIEMBRE 22 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	24535990	22/09/2004	18,196,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

21

De reman en extracto y
2 tarjetas de publicaciones
Jules 3-5
CH
2004-10-22

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US03/06198

A. CLASIFICACION DE MATERIA IPC (7) : C12Q 1/68; C07H 21/02, 21/04 US CL : 435/6; 536/23.1, 24.3 Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI		
B. CAMPOS BUSCADOS Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación) U.S.:435/6;536/23.1,24.3 Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A,P	US 2003/0054386 A1 (ANTONARAKIS et al) 20 de marzo, 2003 (20.03.2003) Ver Resumen.	35 y 36
A,P	US 3003/0082576 A1 (JONES et al) 1 de mayo, 2003 (01.05.2003) Ver Resumen	1-66
A	UGOZZOLI et al. Detección de alelos específicos usando extensión de plantilla de alelo, seguido por la captura de un soporte sólido. GATA, 1992, Vol. 9, No. 4, páginas 107-12. Ver resumen y Figura 1 en la página 110	1-66
A	KWOK, P.-Y. Métodos de cómo dar genotipo a los polimorfismos nucleótidos sencillos. Revisiones Anuales en Genómica y Genética Humana, 2001, Vol. 2 páginas 235-258, ver todo el	1-66
A	SHI, M.M.. Posibilidad de estudios farmacogenéticos a gran escala que permitan un alto rendimiento de la mutación por tecnologías genotipadas y por detección. Quimica Clínica. 2001, Vol. 47, No. 2, páginas 164-172. Ver todo el documento	1-66
A,P	US 6.475,736 A (STANTON, JR) 05 de noviembre del 2002 (05.11.2002) Ver todo del documento	1-66
A	US 5,831,065 A (BRENNER) 03 noviembre 1998 (03.11.1998). Ver todo el documento	1-66

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'Z' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

31 de Julio de 2003 (31.07.2003)

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

02 de Septiembre de 2003

Nombre y dirección de correo de ISA
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 305-3230

Funcionario autorizado
Ethan Whisenant, ph. D.
TELEPHONE Nº. 703-308-0196

Forma PCT ISA 210 (segunda hoja) (Julio 1998)

7
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/US 03/06198**Casilla I Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 1 de la primera hoja)**

Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

2. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:

3. ☐ Reivindicaciones No.:

porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Norma 6.4(a).

Casilla II Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☒ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.

2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.

3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:

4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta

- ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.

- ☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/ US03/ 06198**CASILLA II OBSERVACIONES DONDE SE CARECE DE INVENCION**

Esta solicitud contiene las siguientes invenciones o grupo de invenciones que no están unidas, en cuanto a forma de un concepto inventivo general sencillo bajo PCT, Regla 13.1

Grupo I, reivindicación (s) 1-35, dirigida a un método para detectar una anomalía cromosomática

Grupo II, reivindicación (es) 36-65 dirigidas a un método para determinar la secuencia de un sitio de interés en el DNA fetal

Grupo III, reivindicación (es) 66, dirigida a un juego que comprende un grupo de plantillas y a un juego de instrucciones.

Las invenciones listadas como Grupos I-III no se relacionan con un concepto inventivo general único bajo el PCT Regla 13.1 porque, bajo el PCT Regla 13.2, éstas carecen de las características técnicas especiales correspondientes.

Las Reivindicaciones 1-35 se relacionan en cuanto a que estas requieren la cuantificación de cantidades relativas de los alelos en un sitio de interés de heterocigoto, en donde la cantidad relativa está expresada como una proporción y en donde dicha proporción indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosomática. Las reivindicaciones 36-66 carecen de esta característica técnica especial que distingue a las reivindicaciones 1-35 del arte anterior. Por lo tanto, las 36-66 carecen de unidad con las Reivindicaciones 1-35

Se advierte al solicitante que no hay derecho de protesta por la falta de unidad para cualquier grupo que no haya sido pagado; y ninguna protesta debe presentarse no más tarde de 15 días desde el envío del Reporte de Búsqueda (PCT/ISA/210)

Continuación de B. Campos Investigados Item 3.

USPATFULL y EUROPATFULL via EAST; Caplus y Medline via STN

términos buscados: Genotipo y los SNP o Polimorfismo Nucleotide Sencillo? Alelo?, Anormalidad cromosomática y /o inversión y/o translocación y/o supresión? y/o rompimiento? y/o proporción; tipos y/o restricciones de enzimas y/o endonucleasas, llenar y rellenado y secuencias; DNA fetal, inhibidor lisis de células y/o glutaraldehído, formaldehído, formalina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/06198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C12Q 1/68; C07H 21/02, 21/04

US CL : 435/6; 536/23.1, 24.3

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/6; 536/23.1, 24.3

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	US 2003/0054386 A1 (ANTONARAKIS et al.) 20 March 2003 (20.03.2003), see at least the abstract.	35 and 66
A,P	US 3003/0082576 A1 (JONES et al.) 01 May 2003 (01.05.2003) see at least the abstract.	1-66
A	UGOZZOLI et al. Detection of specific alleles by using allele-specific primer extension followed by capture on solid support. GATA. 1992, Vol. 9, No. 4, pages 107-12, see at least the abstract and Figure 1 on page 110.	1-66
A	KWOK, P.-Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. Annual Reviews in Genomics and Human Genetics. 2001, Vol. 2, pages 235-258, see the entire document.	1-66
A	SHI, M.M. Enabling Large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. Clinical Chemistry. 2001, Vol. 47, No. 2, pages 164-172, see the entire document.	1-66
A,P	US 6,475,736 A (STANTON, JR.) 05 November 2002 (05.11.2002) see the entire document.	1-66
A	US 5,831,065 A (BRENNER) 03 November 1998 (03.11.1998) see the entire document.	1-66

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 July 2003 (31.07.2003)

Date of mailing of the international search report

02 SEP 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Ethun Whisenand, Ph.D.

Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/06198

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I, claim(s) 1-35, drawn to a method for detecting a chromosomal abnormality.

Group II, claim(s) 36-65 drawn to a method for determining the sequence of a locus of interest on fetal DNA.

Group III, claim(s) 66, drawn to a kit comprising a set of primers and a set of instructions.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or a corresponding special technical features.

Claims 1-35 are related in that they require quantitating the relative amounts of the alleles at a heterozygous locus of interest wherein the relative amount is expressed as a ratio and wherein said ratio indicates the presence or absence of a chromosomal abnormality. Claim(s) 36-66 lack this special technical feature which distinguishes Claims 1-35 over the prior art. Therefore, Claim(s) 36-66 lack unity with Claim(s) 1-35.

The applicant is advised that there is no right to protest the lack of unity for any groups not paid for, AND any protest must be filed no later than 15 days from the mailing of the Search Report (PCT/ISA/210).

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

USPATFULL and EUROPATFULL via EAST; CAPLUS and Medline via STN

search terms: Genotyp\$ and SNPs or Single Nucleotide Polymorphism\$ allele\$, chromosom\$ abnormality and/or Inversion and/or translocation and/or deletion\$ and/or break\$ and ratio?; Typell\$ and/or restriction enzyme and/or endonuclease, fill in or fill-in and sequenc\$; fetal DNA, cell lysis inhibitor and/or glutaraldehyde, formaldehyde, formalin.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación
Septiembre 12 de 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 03/074723 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12Q 1/68,
C0711 21/02, 21/04

74)Agentes: WITT, Eric et al. ; Morrison & Fournier LLP, 755 Page Mill
Road, Palo Alto , CA 94304-1018(US).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US03/06198

(81) Estados Designados (nacionales) AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,CR,CU CZ, DE, DK,DM, DZ,
EC,EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,RU, SC,SD, SE, SG, SK, SL, TJ,
TM, TR, TT,TZ, UA, UG,US, UZ,VC, VN, YU, ZA,ZM, ZW.

(22) Fecha de Registro Internacional: 28 de Febrero de 2003
(28.02.03)

(25) Idioma de registro: Inglés

(84) Estados Designados (regionales): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG,ZM, ZW), patente Eurasiática (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY,CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK,TR),
Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:

60/360,232 1 de Marzo de 2002 (01.03. 2002) US
10/093,618 11 de Marzo de 2002 (11.03.2002) US
60/378,354 8 de Mayo de 2002 (08.05.2002) US

Publicado:
- con reporte de búsqueda internacional

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional:
27 de Noviembre de 2003

(71) Solicitante e :

(72) Inventor: DHALLAN, Ravinder [US/US]; 8013 Thorn-ley
Court, Bethesda, MD 20817 (US).

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a
"Las Notas Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen
al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: "METODOS PARA LA DETECCIÓN DE DESÓRDENES GENÉTICOS"

(57) Resumen: La invención presenta un método útil para detección de desórdenes genéticos. El método comprende la determinación de las secuencias de alelos de un sitio de interés y la cuantificación de una proporción para los alelos en un sitio de interés, en donde la proporción indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosomática. Esta invención también presenta un método no invasivo para detección de anomalías cromosomáticas en un feto. La invención es especialmente útil como un método no invasivo para determinar la secuencia del DNA fetal.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 September 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/074723 A3

(15) International Patent Classification: C12Q 1/68,
C07H 21/02, 21/04

(21) International Application Number: PCT/US03/06198

(22) International Filing Date: 28 February 2003 (28.02.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/360,232 1 March 2002 (01.03.2002) US
10/093,618 11 March 2002 (11.03.2002) US
60/378,354 8 May 2002 (08.05.2002) US

CZ, DH, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI,
SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
27 November 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(71) Applicant and
(72) Inventor: DHALLAN, Ravinder [US/US]; 8013 Thorn-
ley Court, Bethesda, MD 20817 (US).

(74) Agents: WITT, Eric et al.; Morrison & Foerster LLP, 755
Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304-1018 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

(54) Title: METHODS FOR DETECTION OF GENETIC DISORDERS

(57) Abstract: The invention provides a method useful for detection of genetic disorders. The method comprises determining the sequence of alleles of a locus of interest, and quantitating a ratio for the alleles at the locus of interest, wherein the ratio indicates the presence or absence of a chromosomal abnormality. The present invention also provides a non-invasive method for the detection of chromosomal abnormalities in a fetus. The invention is especially useful as a non-invasive method for determining the sequence of fetal DNA.

PREVIOUS

WO 03/074723 A3

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

NOTIFICACION DEL REGISTRO DE UN CAMBIO

(Regla 92 bis. 1 del PCT e
Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Para:
WITT. Eric
Morrison & Foerster LLP
755 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304-1018
Estados Unidos de América

Fecha de envío por correo (día/mes/año)
14 de Junio de 2004 (14.06.2004)

Archivo de referencia del solicitante o agente
543312000440

NOTIFICACION IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.
PCT/US2003/006198

Fecha de registro internacional (día/mes/año)
28 de Febrero de 2003 (28.02.2003)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante ☐ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y Dirección
DHALLAN, Ravinder

País de Nacionalidad
US

País de Residencia
US

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☒ la persona ☐ el nombre ☐ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y Dirección
RAVGEN, INC
9241 Rumsey Road
Columbia, MD 21045
Estados Unidos de América

País de Nacionalidad
US

País de Residencia
US

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

La persona identificada en la casilla número uno permanecerá como solicitante/ inventor para Estado Unidos de América solamente. solamente. La persona identificada en la casilla número dos será registrada como solicitante para todos los estados designados excepto Estados Unidos de América.

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina que recibe ☐ las Oficinas designadas relacionadas
☐ la Autoridad de Búsqueda Internacional ☒ las Oficinas seleccionadas relacionadas
☒ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ☐ otros:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Suisse
Facsímile No.: (41-22) 338.70.90

Funcionario autorizado
Ki-Nam HA

Teléfono No.: (41-22) 338 80 31

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

JUN 28 2004

PCT

Morrison & Foerster LLP
Palo AltoNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WITT, Eric
Morrison & Foerster LLP
755 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304-1018
United States of America

Date of mailing (day/month/year)

14 June 2004 (14.06.2004)

Applicant's or agent's file reference

543312000440

International application No.

PCT/US2003/006198

International filing date (day/month/year)

28 February 2003 (28.02.2003)

IMPORTANT NOTIFICATION

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

DHALLAN, Ravinder

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

RAVGEN, INC.
9241 Rumsey Road
Columbia, MD 21045
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box No.1 will remain as applicant/inventor for US only. The person identified in box No.2 will be recorded as applicant for all designated States except US.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO

34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.70.90

Authorized officer

KI-Nam HA

NO DOCKETING REQUIRED

REVIEWED BY DOCKETING

Telephone No. (41-22) 338 8031

INITIALS

008303140

Form PCT/IB/308 (March 1994)

15

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

ERIC H. WITT
MORRISON & FORERSTER LLP
755 PAGE MILL ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA 94304

RECEIVED

NOV 17 2003

Morrison & Forerster LLP
Palo Alto

NOTIFICATION OF RECEIPT

DEMAND BY COMPETENT INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY(PCT Rules 59.3(e) and 61.1(b), first sentence
and Administrative Instructions, Section 601(a))Date of mailing
(day/month/year)

12 NOV 2003

Applicant's or agent's file reference

543312000440

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US03/06198

International filing date (day/month/year)

28 Feb 2003

Priority date (day/month/year)

01 Mar 2002

Applicant

DHALLAN, RAVINDER S

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority considers the following date as the date of receipt of the demand for international preliminary examination of the international application:

01 Oct 2003

2. That date of receipt is:



the actual date of receipt of the demand by this Authority (Rule 61.1(b)).



the actual date of receipt of the demand on behalf of this Authority (Rule 59.3(e)).



the date on which this Authority has, in response to the invitation to correct defects in the demand (Form PCT/IPEA/404), received the required corrections.

3. ☐ ATTENTION: That date of receipt is AFTER the expiration of 19 months from the priority date. Consequently, the election(s) made in the demand does (do) not have the effect of postponing the entry into the national phase until 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)). Therefore, the acts for entry into the national phase must be performed within 20 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 22). For details, see the PCT Applicant's Guide, Volume II.



(If applicable) This notification confirms the information given by telephone, facsimile transmission or in person on:

4. Only where paragraph 3 applies, a copy of this notification has been sent to the International Bureau.

Name and mailing address of the IPEA/
Mail Stop PCT, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 703-305-3230

Form PCT/IPEA/402 (July 1998)

Authorized officer

Jeryl McDowell

Telephone No. 703-305-3639

DOCKETED

71 27

46

(le este transmittido.)
se presento
en 13

METODOS PARA LA DETECCIÓN DE DESÓRDENES GENÉTICOS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La invención presenta un método útil para detección de desórdenes genéticos. El método comprende la determinación de las secuencias de alelos de un sitio de interés y la cuantificación de una proporción para los alelos en un sitio de interés, en donde la proporción indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosomática. Esta invención también presenta un método no invasivo para detección de anomalías cromosomáticas en un feto. La invención es especialmente útil como un método no invasivo para determinar la secuencia del DNA fetal.

METODOS PARA LA DETECCION DE DESORDENES GENETICOS

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud de Patente U.S. No. 10/093, 618, radicada el 11 de Marzo de 2002, y Solicitudes de Patente Provisionales U.S. No. 60/360, 232 y 60/378, 354, radicadas el 1 de Marzo de 2002 y el 8 de Mayo de 2002, respectivamente. Los contenidos de estas solicitudes están incorporados en su totalidad a este para referencia.

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a un método para la detección de desórdenes genéticos incluyendo anomalías y mutilaciones cromosómicas. La presente invención provee un método rápido, no invasivo para la determinación de la secuencia de ADN de un feto. El método es especialmente útil en la detección de anomalías cromosómicas en un feto incluyendo translocaciones, transversiones, monosomías, trisomías, y otras aneuploidías, omisiones, adiciones, ampliaciones, translocaciones y redistribuciones.

TECNICA PREVIA

Las anomalías cromosómicas son las responsables de una porción significativa de defectos genéticos en los humanos nacidos vivos. El núcleo de una célula contiene cuarenta y seis (46) cromosomas, que contienen las instrucciones genéticas y determinan las operaciones de la célula. La mitad de los cuarenta y seis cromosomas se originan de cada padre. Excepto los cromosomas del sexo, que son un poco diferentes entre sí en los machos normales, los cromosomas de la madre y los cromosomas del padre hacen un conjunto emparejado. Los pares eran combinados cuando el huevo era fertilizado por el espermatozoide.

Ocasionalmente ocurre un error, ya sea en la formación o en la combinación de los cromosomas, y el huevo fertilizado se forma con

demasiados o con muy pocos cromosomas, o con cromosomas que están mezclados de alguna forma. Debido a que cada cromosoma contiene muchos genes, las anomalías cromosómicas probablemente causan defectos de nacimiento serios afectando muchos sistemas corporales y frecuentemente incluyen disability desarrollo (e.g., retardo mental).

Las células pueden re-agruparse equivocadamente con extremos rotos de cromosomas, tanto espontáneamente como después de la exposición a compuestos químicos, cancerígenos e irradiación. Cuando ocurre una re-agrupación en un cromosoma, un segmento de cromosoma entre los dos puntos de ruptura se invierte y se clasifica como una inversión. Con inversiones, no hay pérdida de material genético; sin embargo, las inversiones pueden causar daño en un gen crítico o crear un gen de fusión que induce una condición relacionada con enfermedad.

En la translocación recíproca dos cromosomas no homólogos se rompen e intercambian fragmentos. En este escenario, dos cromosomas anormales pueden causar: que cada uno consista de una parte derivada del otro cromosoma y que le falte una parte de sí mismo. Si la translocación es de un tipo balanceado, el individuo no mostrará fenotipos anormales. Sin embargo, durante la formación de la célula-germinal en los individuos que portan translocación, la distribución apropiada de cromosomas en el huevo o espermatozoide usualmente falla, causando aborto espontáneo, malformación o retardo mental de la cría.

En una translocación Robertsoniana, los centromeros de dos cromosomas acrocéntricos (un cromosoma con un centrómero no ubicado centralmente) se fusionan para generar un cromosoma metacéntrico grande. El cariotipo de un individuo con una fusión céntrica tiene uno menos que el número diploide normal de cromosomas.

Los errores que causan demasiados o muy pocos cromosomas también pueden conducir a los fenotipos de enfermedad. Por ejemplo, una copia faltante de cromosoma X (monosomía X) produce el Síndrome de Turner, mientras que una copia adicional del cromosoma 21 produce el Síndrome de Down. Otras enfermedades tales como el Síndrome de Edgard

y el Síndrome de Patau son producidas por una copia adicional del cromosoma 18 y del cromosoma 13 respectivamente.

Una de las anomalías de cromosoma más comunes es conocida como el Síndrome de Down. La incidencia estimada del Síndrome de Down está entre 1,000 a 1,100 nacimientos vivos. Cada año aproximadamente de 3,000 a 5,000 niños nacen en los Estados Unidos con este desorden cromosómico. La gran mayoría de niños con Síndrome de Down (aproximadamente el 95%) tienen un cromosoma 21 extra. Más frecuentemente, el cromosoma extra se origina de la madre. Sin embargo, en aproximadamente el 3-4 por ciento de la gente con Síndrome de Down, una translocación entre el cromosoma 21 y cualquiera del cromosoma 14 o 22 es responsable de la anomalía genética. Finalmente, se nota otro problema de cromosoma llamado mosaiquismo, en aproximadamente el 1 por ciento de los individuos con Síndrome de Down. En este caso algunas células tienen 47 cromosomas y otras tienen 46 cromosomas. Se piensa que el mosaiquismo es el resultado de un error en la división celular poco después de la concepción.

Las anomalías cromosómicas son congénitas, y por lo tanto, el diagnóstico prenatal se puede usar para determinar la condición de salud de un feto no nacido. Sin el conocimiento adquirido mediante el diagnóstico prenatal podría haber consecuencias adversas para el feto, la madre, o ambos. Las anomalías congénitas suman del 20% al 25% de las muertes perinatales. Específicamente, el diagnóstico prenatal es útil para manejar el tiempo restante del embarazo, planeando posibles complicaciones con el proceso del nacimiento, preparándose para los problemas que puedan ocurrir en el infante recién nacido, y encontrando condiciones que puedan afectar futuros embarazos.

Existe una variedad de técnicas no invasivas e invasivas disponibles para el diagnóstico prenatal incluyendo ultrasonografía, amniocentesis, muestreo de vellosidades coriónicas (CVS), células de sangre fetales en sangre materna, alfa-fetoproteína de suero materno, beta-HCG de suero materno y estriol de suero materno. Sin embargo, las técnicas que no son invasivas son menos específicas, y las técnicas con alta especificidad y alta sensibilidad son altamente invasivas. Además, la mayoría de las técnicas

solo se pueden aplicar durante periodos especificos de tiempo durante el embarazo para mayor utilidad.

Ultrasonografia

Este es un procedimiento inofensivo, no invasivo. Las ondas de sonido de alta frecuencia se usan para generar imágenes visibles de los patrones de ecos hechos por diferentes tejidos y órganos, incluyendo al feto en la cavidad amniótica. El embrión en desarrollo se puede visualizar a aproximadamente las 6 semanas de gestación. Los órganos internos más grandes y las extremidades se pueden evaluar para determinar si cualquiera es anormal a aproximadamente las 10 a 20 semanas de gestación.

Un examen de ultrasonido puede ser útil para determinar el tamaño y la posición del feto, la cantidad de fluido amniótico, y la apariencia de la anatomía fetal; sin embargo, hay limitaciones a este procedimiento. Anormalidades delicadas, tales como Síndrome de Down, en donde las anomalías morfológicas usualmente no son marcadas, sino solo delicadas, no se pueden detectar de ninguna forma.

Amniocentesis

Este es un procedimiento altamente invasivo en el cual una aguja es introducida en el abdomen bajo de la madre en la cavidad amniótica dentro del útero. Este procedimiento se puede realizar a aproximadamente las 14 semanas de gestación. Para el diagnóstico prenatal, la mayoría de las amniocentesis se realizan entre las 14 y las 20 semanas de gestación. Sin embargo, se realiza un examen de ultrasonido antes de la amniocentesis para determinar la edad gestacional, la posición del feto y la placenta, y para determinar si hay suficiente fluido amniótico presente. Dentro del fluido amniótico hay células fetales (en su mayoría derivadas de la piel del feto) que se pueden cultivar en un cultivo para análisis cromosómico, bioquímico y biológico molecular.

Las anomalías cromosómicas grandes, como cromosomas extra o faltantes, o fragmentos de cromosoma, se pueden detectar mediante el cariotipo, que incluye la identificación y análisis de los 46 cromosomas de

una célula y los distribuye en sus pares conjugados, con base en las diferencias delicadas de tamaño y estructura. En la visualización sistemática, las anomalías en el número y la estructura de los cromosomas son obvias. Este procedimiento típicamente toma de 7-10 días para terminarlo.

Mientras que la amniocentesis se puede usar para dar información genética directa, los riesgos están asociados con el procedimiento incluyendo pérdida del feto y sensibilización del Rh materno. El riesgo aumentado de la mortalidad fetal después de la amniocentesis es de aproximadamente 0.5% por encima del que se esperaría normalmente. Las madres de Rh negativo se pueden tratar con RhoGam.

Muestreo de vellocidades coriónicas (CVS)

En este procedimiento un catéter es introducido por la vagina a través de la cerviz y en el útero a la placenta en desarrollo por la guía de ultrasonido. La introducción del catéter permite que las células de las vellocidades coriónicas de la placenta se puedan obtener y analizar por medio de una variedad de técnicas, incluyendo análisis cromosómico para determinar el cariotipo del feto. Las células también se pueden cultivar para análisis bioquímico o biológico molecular. Típicamente, el CVS se realiza entre las 9.5 y 12.5 semanas de gestación.

El CVS tiene la desventaja de ser un método invasivo, y tiene baja pero significativa tasa de morbilidad del feto; esta tasa de pérdida está entre 0.5 y 1% mayor que las mujeres sometidas a amniocentesis. Rara vez la CVS se puede asociar con defectos de los miembros en el feto. También está presente la posibilidad de sensibilización del Rh materno. Además, también existe la posibilidad que las células de sangre materna en la placenta en desarrollo sean muestreadas en lugar de las células del feto y se confunda el análisis cromosómico.

Alfa-fetoproteína de suero materno (MSAFP)

El feto en desarrollo tiene dos proteínas de sangre mayores – albúmina y alfa-proteína (AFP). La madre típicamente tiene solo albúmina

en su sangre, y de esta forma, la prueba de MSAFP se puede usar para determinar los niveles de AFP en el feto. Comúnmente, solo una pequeña cantidad de AFP tiene acceso al fluido amniótico y cruza la placenta hacia la sangre de la madre. Sin embargo, si el feto tiene un defecto del conducto neural, entonces más AFP escapa al fluido amniótico. Los defectos de tubo neural incluyen anencefalia (falta del cierre en el extremo craneal del tubo neural). La incidencia de dichos defectos es de aproximadamente 1 o 2 nacimientos por cada 1000 en los Estados Unidos. Además, si hay defectos en la pared abdominal del feto, la AFP del feto terminará en la sangre materna en grandes cantidades.

La cantidad de MSAFP aumenta la edad gestacional, y por ende, para que el ensayo de MSAFP de resultados precisos, se debe saber con certeza la edad gestacional. Además la raza de la madre y la presencia de diabetes gestacional pueden influenciar el nivel de MSAFP que se considere normal. La MSAFP se reporta típicamente como múltiplos del promedio (MoM). A mayor MoM, mayor probabilidad de presencia de defecto. El ensayo de MSAFP tiene la mayor sensibilidad entre los 16 y 18 meses de gestación, pero se puede usar entre las 15 y 22 semanas de gestación. El MSAFP tiende a ser menor cuando el Síndrome de Down, u otras anomalías cromosómicas están presentes.

Aunque el ensayo de MSAFP no es invasivo, la MSAFP no es 100% específica. La MSAFP se puede elevar por una variedad de razones que no están relacionadas con defectos del tubo neural o la pared abdominal del feto. La causa más común de una MSAFP elevada es una estimación equivocada de la edad gestacional del feto. Por lo tanto, los resultados de un ensayo de MSAFP nunca se consideran como definitivos y concluyentes.

Beta-HCG de suero materno

Iniciando a aproximadamente una semana después de la concepción y la implantación del embrión en desarrollo en el útero, el trofoblasto producirá una beta-HCG detectable (la subunidad beta de gonadotropina coriónica humana) que se puede usar para diagnosticar embarazo. La beta-HCG también se puede cuantificar en el suero materno, y este puede ser útil

al inicio del embarazo cuando se sospeche amenaza de aborto o embarazo ectópico, porque a la cantidad de beta-HCG será menor de lo normal.

En la mitad al fin del segundo trimestre, la beta-HCG se puede usar en conjunción con la MSAFP para detectar las anomalías cromosómicas, en particular el Síndrome de Down. Una beta-HCG elevada conjugada con una MSAFP disminuida sugiere síndrome de Down. Niveles altos de HCG sugieren enfermedad trofoblástica (embarazo molar). La ausencia de un feto en la ultrasonografía con una HCG elevada sugiere una mola hidatidiforme.

Estríol de suero materno

La cantidad de estríol en el suero materno depende de un feto viable, de una placenta que funciona adecuadamente, y un bienestar materno. La deshidroepiandrosterona (DHEA) se hace mediante las glándulas adrenales del feto, y se metaboliza en la placenta a estríol. El estríol entra a la circulación materna y es excretada mediante el riñón materno en la orina o mediante el hígado en la bilis. Los niveles normales de estríol, medidos en el tercer trimestre, darán una indicación del bienestar general del feto. Si el nivel de estríol cae, el feto es amenazado y un parto inmediato puede ser necesario. El estríol tiende a ser menor cuando está presente el síndrome de Down y cuando hay hipoplasia adrenal con anencefalia.

El ensayo de Detección Triple

El ensayo de triple detección comprende el análisis de alfa-feto-proteína de suero materno (MSAFP), gonadotropina coriónica humana (HCG) y estríol no conjugado (uE3). El ensayo de sangre se realiza usualmente entre 16-18 semanas después del último período menstrual. Aunque el ensayo de detección triple es no invasivo, los resultados de prueba anormales no son indicativos de un defecto de nacimiento. Más bien, el ensayo solo indica un riesgo incrementado y sugiere que se requieren más ensayos. Por ejemplo, 100 de 1,000 mujeres tendrán un resultado anormal del ensayo de detección triple. Sin embargo, solo 2-3 de 100 mujeres tendrán un feto con un defecto de nacimiento. Esta alta

incidencia de positivos falsos causa un estrés tremendo y ansiedad inn cesaria a la futura madre.

Células fetales aisladas de la Sangre Materna

La presencia de células nucleadas fetales en la sangre materna hace posible el uso de estas células para diagnóstico prenatal no invasivo (Walknowska, et al., Lancet 1:1119-1122, 1969; Lo et al., Lancet 2:1363-65, 1989; Lo et al., Blood 88:4390-95, 1996). Las células fetales se pueden clasificar y analizar por medio de una variedad de técnicas para buscar secuencias de ADN particulares (Bianchi et al., Am. J. Hum. Genet. 61:822-29, (1977); Bianchi et al., PNAS 93:705-08 (1996)). La hibridación in-situ por fluorescencia (FISH) es una técnica que se puede aplicar para identificar cromosomas particulares de las células fetales recuperadas de la sangre materna, y diagnosticar condiciones aneuploides tales como trisomías y monosomías X. Además, se ha reportado que el número de células fetales en la sangre materna aumenta en los embarazos aneuploides.

El método de FISH usa pruebas de ADN marcadas con marcadores de color fluorescente que permiten la detección de cromosomas específicos o genes bajo un microscopio. Usando FISH, anomalías genéticas delicadas que no se pueden detectar mediante el cariotipo estándar son fácilmente identificables. Este procedimiento típicamente toma de 24-48 horas para su terminación. Además, usando un panel de pruebas FISH ADN, se pueden ver los números de copias de cromosoma anormal.

Aunque se han hecho mejoras para el aislamiento y enriquecimiento de las células fetales, aún es difícil encontrar muchas células de sangre fetal. Puede no haber suficientes para determinar confiablemente anomalías del cariotipo fetal o para ensayar otras anomalías. Además, la mayoría de las técnicas requieren tiempo, requieren altos aportes de mano de obra, y son difíciles de implementar para un diseño de alto desempeño.

ADN fetal de la Sangre Materna

El ADN fetal se ha detectado y cuantificado en el plasma materno y el suero (Lo et al., Lancet 350:485-487 (1997); Lo et al., Am. J. hum. Genet.

62:768-775 (1998)). Múltiples tipos de células fetales se encuentran en la circulación materna, incluyendo granulocitos fetales, linfocitos, glóbulos rojos nucleados, y células trofoblastos (Pertl, and Bianchi, Obstetrics and Gynecology 98: 486-490 (2001)). El ADN fetal se puede detectar en el suero en la séptima semana de gestación, y aumenta al final del embarazo. El ADN fetal presente en el suero materno y el plasma es comparable con la concentración de ADN obtenido a partir de los protocolos de aislamiento de células fetales.

Se ha usado el ADN fetal circulante para determinar el sexo del feto (Lo et al., A., J. hum. Genet. 62:768-775 (1998)). Además, se ha detectado el genotipo rhesusD fetal usando ADN fetal. Sin embargo, el diagnóstico y las aplicaciones clínicas del ADN fetal circulante está limitado a los genes que están presentes en el feto pero no en la madre (Pertl and Bianchi, Obstetrics and Gynecology 98:483-490 (2001)). De esta forma, aún existe la necesidad de un método no invasivo que pueda determinar la secuencia del ADN fetal y proveer un diagnóstico definitivo de las anomalías cromosómicas en un feto.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La invención está dirigida a un método para la detección de desordenes genéticos incluyendo mutaciones y anomalías cromosómicas. En una realización preferida, la presente invención se usa para detectar mutaciones y anomalías cromosómicas incluyendo pero sin limitarse a translocación, transversión, monosomía, trisomía y otras aneuploidías, eliminación, adición, extensión, fragmentos, translocación y redistribución. Se pueden detectar numerosas anomalías simultáneamente. La presente invención también provee un método no invasivo para determinar la secuencia de un ADN fetal a partir de una muestra de una hembra embarazada. La presente invención se puede usar para detectar cualquier alteración en la secuencia de gen comparada con la secuencia de tipo nativa, incluyendo, pero sin limitarse a mutación puntual, cambio en el marco de lectura, transición, transversión, adición, inserción, eliminación, adición-eliminación, cambio de marco, sin sentido, mutación reversa y alteración microsatelital.

En una realización, la presente invención está dirigida a un método para la detección de anomalías cromosómicas, que comprende: (a) determinación de la secuencia de alelos de un sitio de interés sobre un template de ADN, y (b) cuantificación de la relación de los alelos en un sitio de interés heterocigótico que fue identificado del sitio de interés de (a), en donde dicha relación indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica.

En otra realización, la presente invención provee un método no invasivo para la determinación de la secuencia en un sitio de interés sobre un ADN fetal que comprende: (a) obtención de una muestra de una hembra embarazada; (b) adición de un inhibidor de lisis de célula a la muestra de (a); (c) obtención del template de ADN de la muestra de (b), en donde dicho template de ADN comprende ADN fetal y ADN materno; y (d) determinación de la secuencia en un sitio de interés sobre un template de ADN.

En otra realización, el template de ADN es obtenido de un muestra que incluye, sin limitarse, a una célula, tejido, sangre, suero, plasma, saliva, orina, secreción vaginal, sangre del cordón umbilical, velloidad coriónica, fluido amniótico, tejido embrionario, embrión, embrión bicelular, embrión de cuatro células, un embrión de ocho células, un embrión 16 células, un embrión 32 células, un embrión de 64 células, un embrión de 128 células, un embrión de 256 células, un embrión de 512 células, un embrión de 1024 células, fluido linfático, fluido cerebroespinal, secreción mucosa, fluido peritoneal, fluido ascítico, materia fecal o transpiración corporal.

En una realización, el template de ADN se obtiene a partir de una muestra de una hembra embarazada.

En una realización preferida, el template de ADN es obtenido a partir de una mujer embarazada.

En otra realización, el template de ADN es obtenido de un embrión. En una realización preferida, el template de ADN es obtenido a partir de una célula simple de un embrión.

En otra realización, el inhibidor de lisis de célula se agrega a la muestra incluyendo, pero sin limitarse, a formaldehído, y derivados de

formaldehído, formalina, glutaraldehído y derivados de glutaraldehído, reticuladores, reticuladores reactivos de amina primaria, reticuladores reactivos de sulfhidrilo, adición de sulfhidrilo o reducción de sulfhidrilo, reticuladores reactivos de carbohidratos, reticuladores reactivos de carboxilo, reticuladores fotoreactivos, reticuladores fragmentables, AEDP, APG, BASED, BM(PEO)₃, BM(PEO)₄, BMP, BMDB, BMH, BMOE, BS3, BSOCOES, DFDNB, DMA, DMP, DMS, DPDPB, DSG, DSP, DSS, DST, DTBP, DTME, DTSSP, EGS, HBVS, sulfo-BSOCOES, Sulfo-DST o Sulfo-EGS.

En otra realización, un agente que evita la destrucción del ADN es agregado a la muestra incluyendo, pero sin limitarse a inhibidores de ADNasa, cloruro de zinc, ácido etilendiamintetraacético, guanidina-HCl, guanidina isotiocianato, N-lauroilsarcosina, y Na-dodecilsulfato.

En una realización adicional, el template de ADN es obtenido a partir del plasma de la sangre de una hembra embarazada. En una realización, el template de ADN es obtenido a partir del suero de la sangre de una hembra embarazada.

En otra realización, el template de ADN comprende ADN fetal y ADN materno. En otra realización, el sitio de interés sobre el template de ADN es seleccionado de un sitio de interés materno homocigótico. En otra realización, el sitio de interés sobre el template de ADN es seleccionado de un sitio de interés materno heterocigótico.

En otra realización, el sitio de interés sobre el template de ADN es seleccionado de un sitio de interés paterno homocigótico. En otra realización, el sitio de interés sobre el template de ADN es seleccionado de un sitio de interés paterno heterocigótico.

En una realización, se determina la secuencia de alelos de múltiples sitios de interés sobre un cromosoma simple. En una realización preferida, se determina la secuencia de alelos de múltiples sitios de interés sobre múltiples cromosomas.

En otra realización, la determinación de alelos de un sitio de interés comprende un método que incluye, pero sin limitarse, PCR específica de alelo, electroforesis en gel, ELISA, espectrometría de masas, hibridación, extensión de la plantilla, polarización de fluorescencia, detección de fluorescencia, transferencia de energía de resonancia con fluorescencia (FRET), secuenciamiento, microformación de ADN, mancha del sur, machas en canal, manchas punteadas, y espectrometría de masas MALDI-TOF.

En una realización preferida, la determinación de la secuencia de alelos de un sitio de interés comprende (a) amplificación del sitio de interés usando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que genera una proyección 5' que contiene un sitio de interés; (b) digestión del ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla; (c) incorporación de un nucleótido en el ADN digerido en (b) usando la proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template; y (d) determinación de la secuencia del sitio de interés mediante la determinación de la secuencia del ADN de (c).

En otra realización, la amplificación puede comprender una reacción de cadena de polimerasa (PCR). En una realización adicional, la temperatura de recocido para el ciclo 1 de PCR puede estar cerca de la temperatura de fusión de la longitud de recocido de la segunda plantilla. En otra realización, la temperatura de recocido para el ciclo 2 de PCR puede estar cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recoce al template de ADN de la primera plantilla. En otra realización, la temperatura de recocido para los ciclos restantes puede estar cerca de la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla.

En otra realización, el sitio de reconocimiento sobre la segunda plantilla es para una enzima de restricción que se corta a una distancia de su sitio de ligamiento y genera una proyección 5', que contiene el sitio de interés. En una realización preferida, el sitio de reconocimiento sobre la segunda plantilla es para una enzima de restricción Tipo IIS. La enzima de restricción Tipo IIS incluye, pero no se limita, a Alw I, Alw26 I, Bsb I, Bbv I, BceA I, Bmr I, Bsa I, Bst71 I, BsmA I, BsmB I, BsmF I, BspM I, Ear I, Fau I,

Fok I, Hga I, Ple I, Sap I, SSfaN I, y SthI32 I, y más preferiblemente BceA I y BsmF I.

En una realización, el extremo 3' de la segunda plantilla está adyacente al sitio de interés. En otra realización, la longitud de recocido de la segunda plantilla es seleccionada del grupo consistente en 35-30, 30-25, 25-20, 20-15, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, y menos de 4 bases.

En otra realización, la amplificación de los sitios de interés que comprenden el uso de primera y segunda plantillas que contienen una porción de un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción, en donde dicho sitio de reconocimiento contiene al menos un nucleótido variable, y después de la amplificación, genera el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción total, y la región 3' de dichas plantillas puede contener disparidades con el template de ADN, y la digestión con dicha enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés.

En una realización preferida, el sitio de reconocimiento para las enzimas de restricción que incluyen pero no se limitan a BsaI I (5' C¹CNNGG 3'), BssK I (5' ¹CCNNGG 3'), Dde I (5' C¹TNAG 3'), EcoN I (5' CCTNN¹NNAGG 3' (SEQ ID NO:7), Fnu4H I (5' GC¹NG 3'), Hinf I (5' G¹ANTC 3'), PflF I (5' GACNC¹NNGTC 3'), Sau96 I (5' G¹GNCC 3'), ScaF I (5' CC¹NGG 3'), TthI 11 I (5' GACN¹NNGTC 3'), y más preferiblemente Fnu4H I y EcoN I, se genera después de la amplificación.

En otra realización, la región 5' de la primera y/o segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción. En una realización preferida, el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción es diferente al sitio de reconocimiento de la enzima de restricción que genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés.

En una realización adicional, el método de la invención además comprende la digestión del ADN con una enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la región 5' de la primera y/o segunda plantilla.

La primera y/o segunda plantilla puede contener un marcador en el terminal 5'. Preferiblemente, la primera plantilla contiene un marcador en el

terminal 5'. El marcador se puede usar para separar el ADN amplificado del template de ADN. El marcador se puede usar para separar el ADN amplificado que contiene el nucleótido marcado del ADN amplificado que no contiene el nucleótido marcado. El marcador, e.g., es seleccionado del grupo consistente en: radioisótopo, molécula informadora fluorescente, molécula informadora quimiluminescente, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, hapteno, biotina, derivado de biotina, fotobiotina, iminobiotina, digoxigenina, avidina, enzima, acridinio, azúcar, enzima, apoenzima, oligonucleótido homopolimérico, hormona, mitad ferromagnética, mitad paramagnética, mitad diamagnética, mitad fosforescente, mitad luminescente, mitad electroquimiluminescente, mitad cromática, mitad que tiene una resonancia detectable del giro del electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductividad eléctrica y combinaciones de estos. Preferiblemente, el marcador es biotina. El marcador de biotina se usa para separar el ADN amplificado del template de ADN usando una matriz de estreptavidina. La matriz de estreptavidina está recubierta sobre los agujeros de una placa microtituladora.

La incorporación de un nucleótido en el método de la invención es mediante una ADN polimerasa que incluye, sin limitarse a ADN polimerasa E. coli, fragmento Klenow de ADN polimerasa I E. coli, ADN polimerasa T7, ADN polimerasa T4, ADN polimerasa T5, polimerasas de clase Klenow, polimerasa Taq, ADN polimerasa Pfu, polimerasa Vent, bacteriofago 29, ADN polimerasa Genomic REDTaq™ o secuenasa. La incorporación de un nucleótido puede además comprender el uso de nucleótidos marcados y no marcados. Se pueden incorporar un nucleótido, dos nucleótidos, tres nucleótidos, cuatro nucleótidos, cinco nucleótidos o más de cinco nucleótidos. Se puede incorporar una combinación de nucleótidos marcados o no marcados. El nucleótido marcado es seleccionado del grupo consistente de un trifosfato dideoxinucleótido y trifosfato deoxinucleótido. El nucleótido no marcado es seleccionado del grupo consistente de un trifosfato dideoxinucleótido y trifosfato deoxinucleótido. El nucleótido marcado es marcado con una molécula seleccionada del grupo consistente de molécula radiactiva, molécula fluorescente, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, hapteno, carbohidrato, biotina, y derivado de biotina, mitad fosforescente, mitad luminescente, mitad electroquimiluminescente, mitad cromática, y mitad que tiene una resonancia detectable de giro de electrón, capacitancia

eléctrica, constante dieléctrica o conductividad eléctrica . Preferiblemente, el nucleótido marcado es marcado con una molécula fluorescente. La incorporación de un nucleótido marcado fluorescente además comprende el uso de una mezcla de nucleótidos fluorescentes y no marcados.

En una realización, la determinación de la secuencia de sitio de interés comprende la detección del nucleótido incorporado. En una realización, la detección es mediante un método seleccionado del grupo consistente de electroforesis en gel, electroforesis capilar, electroforesis de microcanal, electroforesis en gel poliacrilamida, detección de fluorescencia, polarización de fluorescencia, secuenciamiento de ADN, secuenciamiento dideoxi de Sanger, ELISA, espectrometría de masas, espectrometría de masas de tiempo de vuelo, espectrometría de masas cuadrupolar, espectrometría de masas de sector magnético, espectrometría de masas de sector eléctrico, fluorimetría, espectrometría de infrarrojo, espectrometría de ultravioleta, amperimetría palentioestática, hidridación de ADN, microformación de ADN, manchas del sur, manchas en canal y manchas punteadas.

En una realización, se determina la secuencia de los alelos de uno a decenas, a cientos, a miles de sitios de interés sobre un cromosoma simple en el template de ADN. En una realización preferida, se determina la secuencia de alelos de uno a decenas a cientos, a miles de sitios de interés sobre cromosomas múltiples.

En una realización preferida, se sospecha que el sitio de interés contiene un polimorfismo o mutación del nucleótido simple. El método se puede usar para determinar las secuencias de múltiples sitios de interés concurrentemente. El template de ADN puede contener múltiples sitios de un cromosoma simple. El template de ADN puede contener múltiples sitios de diferentes cromosomas. Los sitios de interés sobre el template de ADN se pueden amplificar en una reacción. Alternativamente, cada uno de los sitios de interés sobre el template de ADN se puede amplificar en una reacción separada. El ADN amplificado se puede recolectar antes de la digestión del ADN amplificado. Cada uno de los ADN marcados que contienen un sitio de interés se puede separar antes de la determinación de la secuencia del sitio de interés. En una realización, se sospecha que al

menos uno de los sitios de interés contiene un polimorfismo o una mutación del nucleótido simple.

En otra realización, la relación de alelos en un sitio de interés heterocigótico sobre un cromosoma se compara con la relación de alelos en un sitio de interés heterocigótico sobre un cromosoma diferente. No hay limitación para que los cromosomas que puedan ser comparados. La relación de los alelos en un sitio de interés heterocigótico sobre cualquier cromosoma se puede comparar a la relación de alelos en un sitio de interés heterocigótico sobre cualquier otro cromosoma. En una realización preferida, la relación de alelos en sitios de interés heterocigóticos sobre un cromosoma es sumada y comparada con la relación de alelos en sitios de interés heterocigóticos sobre un cromosoma diferente.

En otra realización, la relación de alelos en un sitio de interés heterocigótico sobre un cromosoma es comparada con la relación de alelos en un sitio de interés heterocigótico sobre dos, tres, cuatro o más de cuatro cromosomas. En otra realización, la relación de alelos de múltiples sitios de interés sobre un cromosoma es comparada con la relación de alelos en múltiples sitios de interés sobre dos, tres, cuatro o más de cuatro cromosomas.

En otra realización, la relación de los alelos en un sitio de interés sobre un cromosoma es comparada con la relación de alelos en un sitio de interés sobre un cromosoma diferente, en donde una diferencia de relaciones indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica. En otra realización, la relación de alelos en múltiples sitios de interés sobre un cromosoma es comparada con la relación de alelos de múltiples sitios de interés sobre un cromosoma diferente, en donde una diferencia en las relaciones indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica.

En otra realización, se determina la secuencia de uno a decenas a cientos a miles de sitios de interés sobre el template de ADN obtenido de una muestra de una hembra embarazada. En una realización, los sitios de interés están sobre un cromosoma. En otra realización, los sitios de interés están sobre múltiples cromosomas.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1A. Un diagrama esquemático que describe una molécula de ADN de doble cadena. Un par de plantillas, descritos como flechas dobladas, flanquean el sitio de interés, descrito como un símbolo triangular en la base N14. El sitio de interés puede ser un polimorfismo de nucleótido simple, mutación puntual, inserción, eliminación, translocación, etc. Cada plantilla contiene un sitio de reconocimiento de enzima de restricción a aproximadamente 10 del terminal 5' descrito como la región "a" en la primera plantilla y como región "d" en la segunda plantilla. El sitio de reconocimiento "a" puede ser de cualquier tipo de enzima de restricción, pero el sitio de reconocimiento "d" es de una enzima de restricción que corta a "n" nucleótidos de su sitio de reconocimiento y deja una proyección 5' y un extremo suspendido 3'. Ejemplos de dichas enzimas incluyen, sin limitarse a, BcaAI y BsmF I. La proyección 5' sirve como un template para la incorporación de un nucleótido en el extremo 3' suspendido.

La primera plantilla se muestra modificada con biotina en el extremo 5' para ayudar la purificación. La secuencia del extremo 3' de las plantillas es tal que las plantillas se recocen a una distancia deseada hacia arriba y hacia abajo del sitio de interés. La segunda plantilla se recoca cerca al sitio de interés: el sitio de recocido, que se describe como región "c" es designado de forma que el extremo 3' de la segunda plantilla se recoca a una base del sitio de interés. La segunda plantilla se puede recocer a cualquier distancia del sitio de interés siempre y cuando la digestión con la enzima de restricción, que reconoce la región "d" sobre esta plantilla, genere una proyección 5' que contenga el sitio de interés. El sitio de recocido de la primera plantilla, descrito como región "b", está a aproximadamente 20 bases.

FIG. 1B. Un diagrama esquemático que describe los pasos de recocido y extensión del primer ciclo de amplificación mediante PCR. El primer ciclo de amplificación se realiza cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recoca al template de ADN de la segunda plantilla, descrito como región "c", y es de 13 pares base en este ejemplo. A esta temperatura tanto la primera como la segunda plantilla se recocen a sus cadenas complementarias respectivas y empieza la extensión descrita por

medio de las líneas punteadas. En este primer ciclo, la segunda plantilla se extiende y copia la región b en donde la primera plantilla se puede recocer en el siguiente ciclo.

FIG 1C. Un diagrama esquemático que describe los pasos de recocido y extensión siguiendo la desnaturalización en el segundo ciclo de amplificación de PCR. El segundo ciclo de amplificación es realizado a una temperatura de recocido más alta (TM2), que está cerca de la temperatura de fusión del 20 por la región 3' de la primera plantilla que se recoce al Template de ADN, descrito como región "b". Por consiguiente a TM2, la primera plantilla, que contiene la región b', que es complementaria a la región b, se puede ligar al ADN que fue copiado en el primer ciclo de la reacción. Sin embargo, a TM2 la segunda plantilla no se puede recocer al template de ADN original o al ADN que fue copiado en el primer ciclo de la reacción porque la temperatura de recocido es muy alta. La segunda plantilla se puede recocer a 13 bases del template de ADN original pero TM2 se calcula a aproximadamente la temperatura de fusión de las 20 bases.

FIG. 1D. Un diagrama esquemático que describe las reacciones de recocido y extensión después de la desnaturalización durante el tercer ciclo de amplificación. En este ciclo, la temperatura de recocido, TM3, es aproximadamente la temperatura de fusión de la segunda plantilla entero, incluyendo las regiones "c" y "d". La longitud de las regiones "c" + "d" es de aproximadamente 27-33 en longitud, y de esta forma TM3 es significativamente mas alta que TM1 y TM2. A esta TM más alta la segunda plantilla, que contiene las regiones c' y d', se recoce al ADN copiado generado en el ciclo 2.

FIG. 1E. Un diagrama esquemático que describe las reacciones de recocido y extensión para los ciclos restantes de amplificación. La temperatura de recocido para los ciclos restantes es TM3, que está cerca de la temperatura de fusión de la segunda plantilla entero. A TM3, la segunda plantilla se liga a los templates que contienen las regiones c' y d', y la primera plantilla se liga a los templates que contienen las regiones a' y b. Mediante el aumento sucesivo de la temperatura de recocido en cada ciclo

para los tres primeros ciclos, de TM1, TM2 y TM3, se reduce significativamente la amplificación no específica.

FIG. 1F. Un diagrama esquemático que describe los sitios de interés amplificados enlazados a una matriz sólida.

FIG. 1G. Un diagrama esquemático que describe el ADN enlazado, amplificado, después de la digestión con la enzima de restricción "d". El extremo "aguas abajo" es liberado en el sobrenadante, y se puede remover mediante el lavado con cualquier buffer adecuado. El extremo aguas arriba que contiene el sitio de interés permanece enlazado a la matriz sólida.

FIG. 1H. Un diagrama esquemático que describe el ADN enlazado amplificado, después del "llenado" con un ddNTP marcado. Se usa una ADN polimerasa para "llenar" la base (N'14) que es complementaria al sitio de interés (N14). En este ejemplo solo los ddNTPs están presentes en esta reacción, de forma que solo el sitio de interés o el SNP de interés es llenado.

FIG. 1I. Un diagrama esquemático que describe el ADN enlazado marcado, después de la digestión con la enzima de restricción "a". El ADN marcado es liberado en el sobrenadante que se puede recolectar para identificar la base que fue incorporada.

FIG. 2. Un diagrama esquemático que describe el template de ADN de doble cadena con un número n de sitios de interés y un número n de pares de plantillas, x_1, y_1 a x_n, y_n , específicamente recocidos de forma que una plantilla flanquea cada sitio de interés. Las primeras plantillas están biotintiladas en el extremo 5', ilustrado mediante $\cdot$, y contienen un punto de reconocimiento de una enzima de restricción, "a", que puede ser cualquier tipo de enzima de restricción. Las segundas plantillas contienen un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción, "d", en donde "d" es un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción que se corta a "n" nucleótidos de su sitio de reconocimiento, y genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés y un extremo 3' suspendido. Las segundas plantillas se recocen adyacentes a los respectivos sitios de interés. La posición exacta del sitio de la enzima de restricción "d" en la segunda plantilla es diseñada de forma que la digestión del producto de PCR de cada sitio de interés con

la enzima de restricción "d" genere una proyección 5' que contenga el sitio de interés y un extremo 3' suspendido. Los sitios de recocido de las primeras plantillas están a aproximadamente 20 bases de longitud y son seleccionados de forma que cada primera plantilla sucesiva esté lejos de su respectiva segunda plantilla. Por ejemplo, si en el sitio 1 el extremo 3' de las plantillas primera y segunda están a Z pares base, entonces en el sitio 2, los extremos 3' de las plantillas primera y segunda están a Z + K pares de base, en donde K = 1, 2, 3 o más de tres bases. Las plantillas para el sitio N están a ZN-1 + K pares de bases. El propósito de hacer que cada primera plantilla sucesiva esté lejos de su respectiva segunda plantilla es que los fragmentos de restricción de "llenado" (generados después de la amplificación, purificación, digestión y marcado como se describe en las FIGS. 1B-1I) difieran en tamaño y puedan ser determinados, por ejemplo mediante electroforesis, para permitir la detección de cada sitio de interés individual.

FIG. 3. Amplificación de PCR de los SNPs usando múltiples temperaturas de recocido. Una muestra que contiene templates de ADN genómicos de treinta y seis humanos voluntarios se analizó para los siguientes cuatro SNPs: SNP HC21S00340 (línea 1), número de identificación como se asignó en la base de datos cSNP del Cromosoma Humano 21, localizado en el cromosoma 21; SNP TSC 0095512 (línea 2), localizado en el cromosoma 1; SNP TSC 0214366 (línea 3), localizado en el cromosoma 1; y SNP TSC 0087315 (línea 4), localizado en el cromosoma 1. Cada SNP fue amplificado mediante PCR usando tres protocolos de temperatura de recocido diferentes, referidos aquí como la temperatura de recocido de severidad baja; temperatura de recocido de severidad media y temperatura de recocido de severidad alta. Sin importar el protocolo de temperatura de recocido, cada SNP fue amplificado para 40 ciclos de PCR. El paso de desnaturalización para cada reacción de PCR se realizó por 30 segundos a 95°C.

FIG. 3A. Fotografía de un gel que muestra la amplificación del PCR de los 4 SNPs diferentes usando el protocolo de temperatura de recocido de severidad baja.

FIG. 3B. Fotografía de un gel que muestra la amplificación del PCR de los 4 SNPs diferentes usando el protocolo de temperatura de recocido de severidad media.

FIG. 3C. Fotografía de un gel que muestra la amplificación del PCR de los 4 SNPs diferentes usando el protocolo de temperatura de recocido de severidad alta.

FIG. 4A. Una descripción de la secuencia de ADN de SNP HC21S00027 (SEC ID Nos. 27 & 28), como se asignó en la base de datos cSNP del Cromosoma Humano 21, localizado en el cromosoma 21. Una primera plantilla (SEC ID No: 17) y una segunda plantilla (SEC ID No: 18) están indicadas arriba y abajo, respectivamente, de la secuencia de HC21S00027 (SEC ID Nos. 27 & 28). La primera plantilla está biotintilada y contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para EcoRI. La segunda plantilla contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BsmF I y contiene 13 bases que se recocen a la secuencia de ADN. El SNP está indicado por R (A/G) y r (T/C) (complementario a R).

FIG. 4B. Una descripción de la secuencia de ADN de SNP HC21S00027 (SEC ID Nos. 27 & 28), como se asignó en la base de datos cSNP del Cromosoma Humano 21, localizado en el cromosoma 21. Una primera plantilla (SEC ID No: 17) y una segunda plantilla (SEC ID No: 18) están indicadas arriba y abajo, respectivamente, de la secuencia de HC21S00027 (SEC ID Nos. 27 & 28). La primera plantilla está biotintilada y contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para EcoRI. La segunda plantilla contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BceA I y tiene 13 bases que se recocen a la secuencia de ADN. El SNP está indicado por R (A/G) y r (T/C) (complementario a R).

FIG. 4C. Una descripción de la secuencia de ADN de SNP TSC0095512 (SEC ID Nos. 29 & 30), del cromosoma 1. La primera plantilla (SEC ID No: 11) y la segunda plantilla (SEC ID No: 20) están indicadas arriba y abajo, respectivamente, de la secuencia de TSC0095512. La primera plantilla está biotintilada y contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para EcoRI. La segunda plantilla contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BsmF I y tiene 13 bases que

se recocen a la secuencia de ADN. El SNP está indicado por S (G/C) y s (C/G) (complementario a S).

FIG. 4D. Una descripción de la secuencia de ADN de SNP TSC0095512 (SEC ID Nos. 29 & 30), del cromosoma 1. La primera plantilla (SEC ID No: 11) y la segunda plantilla (SEC ID No: 12) están indicadas arriba y abajo, respectivamente, de la secuencia de TSC0095512. La primera plantilla está biotintilada y contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para EcoRI. La segunda plantilla contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BcaA I y tiene 13 bases que se recocen a la secuencia de ADN. El SNP está indicado por S (G/C) y s (C/G) (complementario a S).

FIGS. 5A-5D. Un diagrama esquemático que describe las secuencias de nucleótido de SNP HC21S00027 (FIGS. 5A (SEC ID Nos: 31 & 32) y 5B (SEC ID Nos: 31 & 33)) y SNP TSC0095512 (FIGS. 5C (SEC ID Nos: 34 & 35) y 5D (SEC ID Nos: 34 & 36)), después de la amplificación con las plantillas descritas en las figuras 4A - 4D. Los sitios de restricción en la secuencia de la plantilla están indicados en negrita.

FIGS. 6A-6D. Un diagrama esquemático que describe las secuencias de nucleótido de cada SNP amplificado después de la digestión con la enzima de restricción tipo IIS apropiada. Las FIGS. 6A (SEC ID Nos: 31 & 32) y 6B (SEC ID Nos: 31 & 33) describen fragmentos de SNP HC21S00027 digeridos con las enzimas de restricción Tipo IIS BsmF I y BcaA I, respectivamente. Las FIGS. 6C (SEC ID Nos: 34 & 35) y 6D (SEC ID Nos: 34 & 36), describen fragmentos de SNP TSC0095512 digeridos con las enzimas de restricción Tipo IIS BsmF I y BcaA I, respectivamente.

FIGS. 7A-7D. Un diagrama esquemático que describe la incorporación de un nucleótido marcado fluorescentemente usando la proyección 5' del sitio de SNP digerido como un template para "llenar" el extremo 3' suspendido. Las FIGS. 7A (SEC ID Nos: 31, 37 & 41) y 7B (SEC ID Nos: 31, 37 & 39) describen el sitio de SNP HC21S00027 digerido con un ddNTP marcado incorporado (*R^{dd} = nucleótido dideoxi fluorescente). Las FIGS. 7C (SEC ID Nos: 34 & 38) y 7D (SEC ID No: 34), describen el sitio de SNP TSC0095512 digerido con un ddNTP marcado incorporado (*S^{dd} =

nucleótido dideoxi fluorescente). El uso de ddNTPs asegura que el extremo 3' suspendido sea extendido en un nucleótido, que es complementario al nucleótido de interés o el sitio SNP presente en la proyección 5'.

FIG. 7E. Un diagrama esquemático que contiene la incorporación de dNTPs y un ddNTP en la proyección 5' que contiene el sitio SNP. El SNP HC21S00007 fue digerido con BsmF I, que genera una proyección 5' de cuatro bases. El uso de una mezcla de dNTPs y ddNTPs permite que el extremo 3' suspendido se extienda un nucleótido (un ddNTP es incorporado primero (SEC ID Nos: 31, 37 & 41)); dos nucleótidos (un dNTP es incorporado seguido por un ddNTP (SEC ID Nos: 31, 39 & 41)); tres nucleótidos (dos dNTPs son incorporados, seguidos por un ddNTP (SEC ID Nos: 31, 40 & 41)) o cuatro nucleótidos (tres dNTPs son incorporados seguidos por un ddNTP (SEC ID Nos: 31 & 41)).

Todos los cuatro productos se pueden separar por tamaño, y se puede detectar el nucleótido incorporado (*R-dd = nucleótido dideoxi fluorescente). La detección del primer nucleótido, que corresponde al SNP o el sitio, y los siguientes tres nucleótidos provee un nivel adicional de aseguramiento de calidad. El SNP es indicado mediante R (A/G) y r (T/C) (complementario a R).

FIGS. 8A - 8D. Liberación del SNP "llenado" de la matriz de soporte sólida, i.e., agujero recubierto de estreptavidina. La SNP HC21S00027 se muestra en las FIGS. 8A (SEC ID Nos: 31, 37 & 41) y 8B (SEC ID Nos: 31, 37 & 39), mientras que la SNP TSC0095512 se muestra en las FIGS. 8C (SEC ID Nos: 34 & 38) y 8D (SEC ID Nos: 34). El SNP "llenado" está libre en solución, y se puede detectar.

FIG. 9A. Análisis de la secuencia de SNP HC21S00027 digerido con BceA I. Se muestran cuatro reacciones de "llenado"; cada reacción contiene un nucleótido marcado fluorescentemente, ddGTP, ddATP, ddTTP, o ddCTP, y ddNTPs no marcados. Se indica la proyección 5' generado por la digestión con BceA I y los nucleótidos esperados en este sitio SNP.

FIG. 9B. Análisis de la secuencia de SNP TSC0095512. El SNP TSC0095512 fue amplificado con una segunda plantilla que contenía el sitio de reconocimiento para BceA I, y en una reacción separada, con una

40

segunda plantilla que contenía el sitio de reconocimiento para BsmF I. Se muestran cuatro reacciones de "llenado" para cada producto de PCR; cada reacción contenía un nucleótido marcado fluorescentemente, ddGTP, ddATP, ddTTP, o ddTCP, y ddNTPs no marcados. Se indica la proyección 5' generado por la digestión con BceA I y BmsF I, y los nucleótidos esperados en este sitio de SNP.

FIG. 9C. Análisis de la secuencia de SNP TSC0264580 después de la amplificación con una segunda plantilla que contenía el sitio de reconocimiento para BsmF I. Se muestran cuatro reacciones; cada reacción contenía un nucleótido marcado fluorescentemente, ddGTP, ddATP, ddTTP, o ddTCP, y ddNTPs no marcados. Se describen dos proyecciones 5' diferentes; una representa las moléculas de ADN que fueron cortadas a 11 nucleótidos en la dirección de la cadena, y a 15 nucleótidos en la dirección contraria de la cadena, y la otra representa moléculas de ADN que fueron cortadas a 10 nucleótidos en la dirección de la cadena, y a 14 nucleótidos en la dirección contraria de la cadena. También se indican los nucleótidos esperados.

FIG. 9D. Análisis de la secuencia de SNP HC21S00027 amplificado con una segunda plantilla que contenía el sitio de reconocimiento para BsmF I. Se usó una mezcla de ddNTPs marcados y dNTPs no marcados para llenar la proyección 5' generada por la digestión con BsmF I. Se describen dos proyecciones 5' diferentes: una representa las moléculas de ADN que fueron cortadas a 11 nucleótidos en la dirección de la cadena, y a 15 nucleótidos en dirección contraria de la cadena, y la otra representa moléculas de ADN que fueron cortadas a 10 nucleótidos en la dirección de la cadena, y a 14 nucleótidos en la dirección contraria de la cadena. Se indican el nucleótido del SNP, el nucleótido en el sitio de SNP (la muestra contenía templates de ADN de 36 individuos; se esperaba que ambos nucleótidos están representados en la muestra), y los tres nucleótidos aguas abajo del SNP.

FIG. 10. Análisis de secuencia de SNPs múltiples. Los SNPs HC21S00131 y HC21S00027, que están localizados en el cromosoma 21, y los SNPs TSC0087315, SNP TSC 0214366, SNP TSC413944 y SNP TSC0085512, que están localizados en el cromosoma 1 fueron amplificados

44

en reacciones de PCR separadas con segundas plantillas que contenían un sitio de reconocimiento para BsmF I. Las plantillas fueron diseñadas de forma que cada sitio de interés amplificado fuera de un tamaño diferente. Después de la amplificación, las reacciones fueron recolectadas en una muestra simple, y todos los pasos siguientes del método se realizaron (como se describe en las figuras 1F-1I) sobre esa muestra. Se indica cada SNP y el nucleótido encontrado en cada SNP.

FIG. 11. Cuantificación del porcentaje de ADN fetal en la sangre materna. La sangre se obtuvo de una mujer embarazada con consentimiento. El ADN fue aislado y se hicieron diluciones seriales para determinar el porcentaje de ADN fetal presente en la muestra. El gen SRY, que está localizado en el cromosoma Y, se usó para detectar el ADN fetal. El gen de fibrosis quística, que está localizado en el cromosoma 7, se usó para detectar el ADN materno y fetal.

FIG. 11A. Amplificación del gen SRY y el gen de fibrosis quística usando un template de ADN aislado de una muestra de sangre que se trató con EDTA.

FIG. 11B. Amplificación del gen SRY y el gen de fibrosis quística usando un template de ADN aislado de una muestra de sangre que se trató con formalina y EDTA.

FIG. 12. Análisis genético de un individuo genotipado previamente con Trisomía 21 (Síndrome de Down). La sangre fue recolectada, con consentimiento, de un individuo que había sido genotipado previamente con Trisomía 21. El ADN fue aislado de dos SNPs en el cromosoma 21 y dos SNPs en el cromosoma 13 fueron genotipados. Como se muestra en la fotografía del gel, los SNPs en el cromosoma 21 muestran relaciones desproporcionadas de los dos nucleótidos. La inspección visual del gel demuestra que un nucleótido de los dos nucleótidos en los sitios de SNP analizado en el cromosoma 21 es de intensidad mayor, sugiriendo que no está presente en una relación 50:50. Sin embargo, la inspección visual del gel sugiere que los nucleótidos en los sitios SNP heterocigótico analizados en el cromosoma 21 están presentes en la relación 50:50 esperada.

42

FIG. 13. Determinación de la secuencia de ambos alelos de los SNPs TSC0837969, TSC0034767, TSC1130902, TSC0597888, TSC0195492, TSC0607185, usando un nucleótido marcado fluorescentemente. Se usó ddGTP marcado en presencia de un dATP, dCTP, dTTP no marcado para "llenar" la proyección generado por la digestión con BsmF I. El nucleótido que precede al sitio variable sobre la cadena que fue llenada no era guanina, y el nucleótido después del sitio variable sobre la cadena que fue llenada no era guanina. El nucleótido dos bases después del sitio variable sobre la cadena que fue llenada era guanina. Los alelos que contienen guanina en el sitio variable son llenados con ddGTP marcado. Los alelos que no contienen guanina son llenados con dATP, dCTP, o dTTP no marcado, y la polimerasa continua incorporando nucleótidos hasta que el ddGTP marcado es llenado en una posición 3 complementaria a la proyección.

FIG. 14. Identificación de los SNPs con los alelos que son variables dentro de la población. Las secuencias de ambos alelos de siete SNPs localizados en el cromosoma 13 fueron determinadas usando un template de ADN que contenía ADN obtenido de doscientos cuarenta y cinco individuos. Se usó ddGTP marcado en presencia de dATP, dCTP o dTTP no marcados para llenar la proyección generado por la digestión con BmsF I. El nucleótido que precede al sitio variable sobre la cadena que fue llenada no era guanina, y el nucleótido después del sitio variable sobre la cadena que fue llenada no era guanina. El nucleótido dos bases después del sitio variable sobre la cadena que fue llenada era guanina. Los alelos que contienen guanina en el sitio variable son llenados con ddGTP marcado. Los alelos que no contienen guanina son llenados con dATP, dCTP, o dTTP no marcado, y la polimerasa continua incorporando nucleótidos hasta que el ddGTP marcado es llenado en una posición 3 complementaria a la proyección.

FIG. 15. Determinación de la relación de un alelo al otro alelo en los SNPs heterocigótico. Los nucleótidos observados para SNP TSC0607185 son citosina (referida como alelo 1) y timidina (referida como alelo 2) en la dirección de la cadena. La relación de alelo 2 a alelo 1 se calculó usando template de ADN aislado de cinco individuos. La relación de alelo 2 a alelo 1 (alelo 2/alelo 1) fue consistentemente 1:1.

Los nucleótidos observados para SNP TSC1130902 son guanina (referida como alelo 1) y adenina (referida como alelo 2) en la dirección de la cadena. La relación de alelo 2 a alelo 1 se calculó usando template de ADN aislado de cinco individuos. La relación de alelo 2 a alelo 1 (alelo 2/alelo 1) fue consistentemente 75:25.

FIG. 16. El porcentaje de alelo 2 a alelo 1 en SNP TSC0108992 permanece lineal cuando es calculado sobre el template de ADN que contiene una copia extra de cromosoma 21. El SNP TSC0108992 fue amplificado usando template de ADN de cuatro individuos, y se realizaron dos reacciones de llenado separadas (marcadas como A y B) para cada reacción de PCR (marcadas 1 a 4). El porcentaje calculado de alelo 2 a alelo 1 sobre el template de ADN de individuos normales fue 0.47. La desviación del porcentaje predicho teóricamente de 0.50 permaneció lineal sobre el template de ADN aislado de un individuo con Síndrome de Down.

FIG. 17A. Análisis de un SNP localizado en el cromosoma 21 de un template de ADN aislado de un individuo con un cariotipo genético normal. El SNP TSC0108992 fue amplificado usando los métodos descritos aquí, y después de la digestión con la enzima de restricción Tipo IIS BsmF I, la proyección 5' fue llenada usando ddTTP marcado, y dATP, dCTP y dGTP no marcado. Se llevaron a cabo tres reacciones de PCR separadas, y cada reacción de PCR fue dividida en dos muestras. Se calculó la relación de alelo 2 a alelo 1 (alelo 2 / (alelo 2 + alelo 1)), que produjo una media de 0.50.

FIG. 17B. Análisis de un SNP localizado en el cromosoma 21 de un template de ADN aislado de un individuo con un cariotipo genético de trisomía 21. El SNP TSC0108992 fue amplificado usando los métodos descritos aquí, y después de la digestión con la enzima de restricción Tipo IIS BsmF I, la proyección 5' fue llenada usando ddTTP marcado, y dATP, dCTP y dGTP no marcado. Se llevaron a cabo tres reacciones de PCR separadas, y cada reacción de PCR fue dividida en dos muestras. Se calculó la relación de alelo 2 a alelo 1 (alelo 2 / (alelo 2 + alelo 1)), que produjo una media de 0.30.

FIG. 17C. Análisis de un SNP localizado en el cromosoma 21 de una mezcla compuesta de template de ADN aislado de un individuo con un

Trisomía 21 y de un individuo con un cariotipo genético normal en una relación 3:1 (Trisomía 21:Normal). El SNP TSC0108992 fue amplificado de la mezcla de template de ADN usando los métodos descritos aquí, y después de la digestión con la enzima de restricción Tipo IIS BsmF I, la proyección 5' fue llenada usando ddTTP marcado, y dATP, dCTP y dGTP no marcado. Se llevaron a cabo tres reacciones de PCR separadas, y cada reacción de PCR fue dividida en dos muestras. Se calculó la relación de alelo 2 a alelo 1 ($\text{alelo 2} / (\text{alelo 2} + \text{alelo 1})$), que produjo una media de 0.319.

FIG. 17D. Análisis de un SNP localizado en el cromosoma 21 de una mezcla compuesta de template de ADN aislado de un individuo con un Trisomía 21 y de un individuo con un cariotipo genético normal en una relación 1:1 (Trisomía 21:Normal). El SNP TSC0108992 fue amplificado de la mezcla de template de ADN usando los métodos descritos aquí, y después de la digestión con la enzima de restricción Tipo IIS BsmF I, la proyección 5' fue llenada usando ddTTP marcado, y dATP, dCTP y dGTP no marcado. Se llevaron a cabo tres reacciones de PCR separadas, y cada reacción de PCR fue dividida en dos muestras. Se calculó la relación de alelo 2 a alelo 1 ($\text{alelo 2} / (\text{alelo 2} + \text{alelo 1})$), que produjo una media de 0.352.

FIG. 17E. Análisis de un SNP localizado en el cromosoma 21 de una mezcla compuesta de template de ADN aislado de un individuo con un Trisomía 21 y de un individuo con un cariotipo genético normal en una relación 1:2.3 (Trisomía 21:Normal). El SNP TSC0108992 fue amplificado de la mezcla de template de ADN usando los métodos descritos aquí, y después de la digestión con la enzima de restricción Tipo IIS BsmF I, la proyección 5' fue llenada usando ddTTP marcado, y dATP, dCTP y dGTP no marcado. Se llevaron a cabo tres reacciones de PCR separadas, y cada reacción de PCR fue dividida en dos muestras. Se calculó la relación de alelo 2 a alelo 1 ($\text{alelo 2} / (\text{alelo 2} + \text{alelo 1})$), que produjo una media de 0.382.

FIG. 17F. Análisis de un SNP localizado en el cromosoma 21 de una mezcla compuesta de template de ADN aislado de un individuo con un Trisomía 21 y de un individuo con un cariotipo genético normal en una

relación 1:4 (Trisomía 21:Normal). El SNP TSC0108992 fue amplificado de la mezcla de template de ADN usando los métodos descritos aquí, y después de la digestión con la enzima de restricción Tipo IIS BsmF I, la proyección 5' fue llenada usando ddTTP marcado, y dATP, dCTP y dGTP no marcado. Se llevaron a cabo tres reacciones de PCR separadas, y cada reacción de PCR fue dividida en dos muestras. Se calculó la relación de alelo 2 a alelo 1 ($\text{alelo 2} / (\text{alelo 2} + \text{alelo 1})$), que produjo una media de 0.397.

FIG. 18A. Análisis en gel de agarosa de nueve (9) SNPs amplificados de un template de ADN. Cada uno de los nueve SNPs fue amplificado del ADN genómico usando los métodos descritos aquí. La línea 1 corresponde a TSC0397235, la línea 2 corresponde a TSC0470003, la línea 3 corresponde a TSC1649276, la línea 4 corresponde a TSC1261039, la línea 5 corresponde a TSC0310507, la línea 6 corresponde a TSC1650432, la línea 7 corresponde a TSC1335008, la línea 8 corresponde a TSC0128307 y la línea 9 corresponde a TSC0259757.

FIG. 18B. El template de ADN original fue amplificado usando plantillas de 12 bases que se recoció en diferentes regiones en el cromosoma 13. Se usaron cien juegos de plantillas diferentes para amplificar las regiones a lo largo del cromosoma 13. Para cada uno de los nueve SNPs, se usó una plantilla que se recoció a aproximadamente 130 bases del sitio de interés y 130 bases aguas abajo del sitio de interés. Esta reacción de amplificación, que contenía un total de 100 juegos de plantillas diferentes, se usó para amplificar las regiones que contenían los sitios de interés. El producto PCR resultante se usó en una reacción de PCR posterior, en donde cada uno de los nueve SNPs se amplificó individualmente usando una primera plantilla y una segunda plantilla, en donde la segunda plantilla contenía el sitio de ligamiento para la enzima de restricción tipo IIS BsmF I. Los SNPs fueron cargados en el mismo orden que en la figura 18A.

FIG. 19A. Cuantificación del porcentaje de alelo 2 a alelo 1 para el SNP TSC047003 en el template de ADN original (IA) y el template de ADN multiplexado (M1-M3), en donde el ADN fue amplificado, primero usando plantillas de 12 bases que se cocieron a 150 bases aguas arriba y aguas

abajo de los sitios de interés. Luego se realizaron tres reacciones de PCR separadas sobre el template de ADN multiplexado, usando una primera y segunda plantilla.

FIG. 19B. Cuantificación del porcentaje de alelo 2 a alelo 1 para el SNP TSC1261039 en el template de ADN original (IA) y el template de ADN multiplexado (M1-M3), en donde el ADN fue amplificado primero usando plantillas de 12 bases que se cocieron a 150 bases aguas arriba y aguas abajo de los sitios de interés. Luego se realizaron tres reacciones de PCR separadas sobre el template de ADN multiplexado, usando una primera y segunda plantilla.

FIG. 19C. Cuantificación del porcentaje de alelo 2 a alelo 1 para el SNP TSC310507 en el template de ADN original (IA) y el template de ADN multiplexado (M1-M3), en donde el ADN fue amplificado primero usando plantillas de 12 bases que se cocieron a 150 bases aguas arriba y aguas abajo de los sitios de interés. Luego se realizaron tres reacciones de PCR separadas sobre el template de ADN multiplexado, usando una primera y segunda plantilla.

FIG. 19D. Cuantificación del porcentaje de alelo 2 a alelo 1 para el SNP TSC1335008 en el template de ADN original (IA) y el template de ADN multiplexado (M1-M3), en donde el ADN fue amplificado primero usando plantillas de 12 bases que se cocieron a 150 bases aguas arriba y aguas abajo de los sitios de interés. Luego se realizaron tres reacciones de PCR separadas sobre el template de ADN multiplexado, usando una primera y segunda plantilla.

FIG. 20. Detección del ADN fetal del ADN de plasma aislado de una hembra embarazada. Cuatro SNPs en donde el ADN materno era homocigótico fueron analizados en el ADN de plasma. El ADN materno fue homocigótico para adenina en TSC0838335 (línea 1), mientras que el ADN de plasma mostró un patrón heterocigótico (línea 2). El alelo de guanina representó el ADN fetal, que se distinguió claramente de la señal materna. El ADN materno y el ADN de plasma fueron ambos homocigóticos para adenina en TSC0418134 (líneas 3 y 4). El ADN materno fue homocigótico para guanina en TSC0129188 (línea 5), mientras que el ADN de plasma

mostró un patrón heterocigótico (línea 6). El alelo de adenina representó el ADN fetal. El ADN materno y el ADN de plasma fueron ambos homocigóticos para adenina en TSC0501389 (líneas 7 y 8).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención provee un método para la detección de desordenes genéticos, incluyendo pero sin limitarse a mutaciones, inserciones, eliminaciones y anomalías cromosómicas, y es especialmente útil para la detección de desordenes genéticos de un feto. El método es especialmente útil para la detección de una translocación, adición, amplificación, transversión, inversión, aneuploidía, poliploidía, monosomía, trisomía, trisomía 21, trisomía 14, trisomía 15, trisomía 16, trisomía 18, trisomía 22, triploidía, tetraploidía, u anomalías cromosómicas de sexo incluyendo XO, XXY, XYY y XXX. El método también provee una técnica no invasiva para la determinación de la secuencia del ADN fetal.

La invención está dirigida a un método para la detección de anomalías cromosómicas, que comprende: (a) determinación de la secuencia de alelos de un sitio de interés sobre un template de ADN, y (b) cuantificación de la relación de los alelos en un sitio de interés heterocigótico que fue identificado del sitio de interés de (a), en donde dicha relación indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica.

En otra realización, la presente invención provee un método no invasivo para la determinación de la secuencia en un sitio de interés sobre un ADN fetal que comprende: (a) obtención de una muestra de una hembra embarazada; (b) adición de un inhibidor de lisis de célula a la muestra de (a); (c) obtención del template de ADN de la muestra de (b), en donde dicho template de ADN comprende ADN fetal y ADN materno; y (d) determinación de la secuencia en un sitio de interés sobre un template de ADN.

Template de ADN

Por "sitio de interés" se entiende una región seleccionada de un ácido nucleico que está dentro de una región más grande de ácido nucleico. Un

sitio de interés puede incluir, sin limitarse a 1-100, 1-50, 1-20 o 1-10 nucleótidos, preferiblemente 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 nucleótido.

Como se usa aquí, un "alelo" es una de varias formas alternas de un gen o región no codificada de ADN que ocupa la misma posición en un cromosoma. El término alelo se puede usar para describir el ADN de cualquier organismo, incluyendo pero sin limitarse a bacterias, virus, hongos, protozoos, mohos, levaduras, plantas, humanos, no-humanos, animales y arqueobacteria.

Por ejemplo, las bacterias típicamente tienen una cadena larga de ADN. El término alelo con respecto al ADN bacterial se refiere a la forma de un gen encontrado en una célula comparado con la forma del mismo gen en una célula bacterial diferente de la misma especie.

Los alelos pueden tener la secuencia idéntica o puede variar por un nucleótido simple o más de un nucleótido. Con respecto a organismos que tienen dos copias de cada cromosoma, si ambos cromosomas tienen el mismo alelo, la condición es referida como homocigótica. Si los alelos en los dos cromosomas son diferentes, la condición es referida como heterocigótica. Por ejemplo, si el sitio de interés es SNP X en el cromosoma 1, y el cromosoma materno contiene una adenina en el SNP X (alelo A), y el cromosoma paterno contiene una guanina en el SNP X (alelo G), el individuo es heterocigótico en SNP X.

Como se usa aquí, secuencia significa la identidad de un nucleótido o más de un nucleótido contiguo en un polinucleótido. En el caso de un nucleótido simple, e.g., un SNP, "secuencia" e "identidad" se usan indistintamente aquí.

El término "anormalidad cromosómica" se refiere a una desviación entre la estructura del cromosoma sujeto y un cromosoma homólogo normal. El término "normal" se refiere al cariotipo predominante o patrón de bandeo encontrado en individuos saludables de especies particulares. Una anomalía cromosómica puede ser numérica o estructural, e incluye sin limitarse a aneuploidía, poliploidía, inversión, una trisomía, una monosomía, duplicación, eliminación, eliminación de una parte del cromosoma, adición,

adición de una parte del cromosoma, inserción, un fragmento de un cromosoma, redistribución cromosómica y translocación. Una anomalía cromosómica puede estar correlacionada con la presencia de una condición patológica o con una predisposición a desarrollar una condición patológica. Como se define aquí, un polimorfismo de nucleótido simple ("SNP") no es una anomalía cromosómica.

Como se usa aquí con respecto a los individuos, "alelos mutantes" se refieren a los alelos variantes que están asociados con un estado de enfermedad.

El término "template" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que se puede usar para amplificar la invención. El RNA o ADN que no es naturalmente de doble cadena se puede convertir en ADN de doble cadena para ser usado como template de ADN. Cualquier ADN de doble cadena o preparación que contiene moléculas de ADN múltiples de doble cadena diferente se pueden usar como template de ADN para amplificar el sitio o sitios de interés contenidos en el template de ADN.

El template de ADN se puede obtener de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitarse a humanos, no-humanos, mamíferos, reptiles, ganado, gatos, perros, cabras, cerdos, marranos, micos, simios, gorilas, toros, vacas, osos, caballos, ovejas, aves, ratones, ratas, peces, delfines, ballenas y tiburones.

El template de ADN puede ser de cualquier muestra apropiada incluyendo pero sin limitarse a muestras de tejido que contienen ácido nucleico, fluido corporal (por ejemplo, sangre, suero, plasma, saliva, orina, lágrimas, fluido peritoneal, fluido ascítico, secreción vaginal, fluido linfático, fluido cerebroespinal o secreción mucosa), sangre del cordón umbilical, vellocidades coriónicas, fluido amniótico, un embrión, un embrión, embrión bicelular, embrión de cuatro células, un embrión de ocho células, un embrión de 16 células, un embrión 32 células, un embrión de 64 células, un embrión de 128 células, un embrión de 256 células, un embrión de 512 células, un embrión de 1024 células, tejidos embrionarios, fluido linfático, fluido cerebroespinal, secreción mucosa, u otra transpiración corporal, materia fecal, una célula individual o extracto de dichas fuentes que contienen ácido

47

nucléico de las mismas, y estructuras sub-celulares como mitocondria, usando protocolos bien establecidos en la técnica.

En una realización, el template de ADN se puede obtener de una muestra de una hembra embarazada. En otra realización, el template de ADN se puede obtener de un embrión. En una realización preferida, el template de ADN se puede obtener de un embrión unicelular.

En una realización, el template de ADN es ADN fetal. El ADN fetal se puede obtener de fuentes que incluyen, sin limitarse a sangre materna, suero materno, plasma materno, células fetales, sangre del cordón umbilical, villi croniónico, fluido amniótico, células o tejidos.

En otra realización, el inhibidor de lisis de célula se agrega a la muestra incluyendo, pero sin limitarse, a formaldehído, derivados de formaldehído, formalina, glutaraldehído, derivados de glutaraldehído, reticuladores, reticuladores reactivos de amina primaria, reticuladores reactivos de sulfhidrilo, adición de sulfhidrilo o reducción de sulfhidrilo, reticuladores reactivos de carbohidratos, reticuladores reactivos de carboxilo, reticuladores fotoreactivos, reticuladores fragmentables, AEDP, APG, BASED, BM(PEO)₃, BM(PEO)₄, BMP, BMDB, BMH, BMOE, BS3, BSOCOES, DFDNB, DMA, DMP, DMS, DPDPB, DSG, DSP, DSS, DST, DTBP, DTME, DTSSP, EGS, HBVS, sulfo-BSOCOES, Sulfo-DST o Sulfo-EGS. En otra realización, se pueden agregar a la muestra dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco inhibidores de lisis de célula.

En otra realización, el template de ADN contiene ADN materno y ADN fetal. En una realización preferida, el template de ADN es obtenido de la sangre de una hembra embarazada. La sangre es recolectada usando cualquier técnica estándar de recolección de sangre, incluyendo pero sin limitarse a venipuntura. Por ejemplo, la sangre puede ser sacada de una vena de adentro del codo y de la parte posterior de la mano. Las muestras de sangre se pueden recolectar de una hembra embarazada en cualquier tiempo durante la gestación fetal. Por ejemplo, las muestras de sangre se pueden recolectar de mujeres a las 1-4, 4-8, 8-12, 12-16, 16-20, 20-24, 24-28, 28-32, 32-36, 36-40, o 40-44 semanas de gestación fetal, y preferiblemente entre las 8-28 semanas de gestación fetal.

57

La muestra de sangre es centrifugada para separar el plasma de las células maternas. El plasma y las fracciones de células maternas son transferidos para separar los tubos y re-centrifugarlos. La fracción de plasma contiene ADN fetal libre de células y ADN materno. Cualquier técnica estándar de aislamiento de ADN se puede usar para aislar el ADN fetal y el ADN materno, incluyendo sin limitarse a QIAamp ADN Blood Midi Kit suministrado por QIAGEN (Número de catálogo 51183).

En una realización preferida, la sangre puede ser recolectada en un aparato que contiene un quemador de magnesio que incluye, sin limitarse a EDTA, y es almacenado a 4°C. Opcionalmente, se puede agregar un quelador de calcio que incluye, sin limitarse a EGTA.

En otra realización, se adiciona un inhibidor de lisis de célula a la sangre materna incluyendo, sin limitarse a formaldehído, derivados de formaldehído, formalina, glutaraldehído, derivados de glutaraldehído, reticuladores reactivos de amina primaria, reticuladores reactivos de sulfhidrilo, adición de sulfhidrilo o reducción de sulfhidrilo, reticuladores reactivos de carbohidratos, reticuladores reactivos de carboxilo, reticuladores fotoreactivos, reticuladores fragmentables, AEDP, APG, BASED, BM(PEO)₃, BM(PEO)₄, BMP, BMDB, BMH, BMOE, BS3, BSOCOES, DFDNB, DMA, DMP, DMS, DPDPB, DSG, DSP, DSS, DST, DTBP, DTME, DTSSP, EGS, HBVS, sulfo-BSOCOES, Sulfo-DST o Sulfo-EGS.

En otra realización, el template de ADN se obtiene del plasma o suero de la sangre de una hembra embarazada. El porcentaje de ADN fetal en el plasma materno está entre 0.39-11.9% (*Pertl, and Bianchi, Obstetrics and Gynecology* 98: 483-490 (2001)). La mayoría del ADN en la muestra de plasma es materno, lo que hace difícil usar el ADN para genotipar al feto. Sin embargo, los métodos que aumentan el porcentaje de ADN fetal en el plasma materno permiten determinar la secuencia del ADN fetal, y permiten la detección de desórdenes genéticos incluyendo mutaciones, inserciones, eliminaciones y anomalías cromosómicas. La adición de los inhibidores de lisis de célula a la muestra de sangre materna puede aumentar el porcentaje relativo del ADN fetal. Aunque la lisis de las células materna y fetal se inhibe, la gran mayoría de las células son maternas, reduciendo de

esta forma la lisis de las células maternas, hay un relativo incremento en el porcentaje de ADN fetal libre. Ver Ejemplo 4.

En otra realización, se puede usar cualquier método, protocolo o equipo para recolectar sangre que reduce la cantidad de lisis de célula, incluyendo pero sin limitarse a una aguja macho grande, una aguja de longitud más corta, un recubrimiento de aguja que aumenta el flujo laminar, e.g., teflón, una modificación del bisel de la aguja para aumentar el flujo laminar, o técnicas que reducen la velocidad del flujo de sangre. Probablemente las células fetales son destruidas en la sangre materna por el sistema inmune de la madre. Sin embargo, es probable que una gran porción de la lisis de célula materna se encuentre como resultado de la recolección de sangre. De esta forma, los métodos que evitan o reducen la lisis de célula reducirán la cantidad que ADN materno en la muestra, e incrementarán el porcentaje relativo de ADN fetal libre.

En otra realización, se puede usar un agente que preserva la integridad estructural de las células para reducir la cantidad de lisis de célula.

En otra realización, se pueden agregar a la muestra de sangre agentes que previenen la destrucción del ADN, incluyendo pero sin limitarse a inhibidor de ADNasa, cloruro de zinc, ácido etilendiamintetraacético, guanidina-HCl, guanidina isotiocianato, N-lauroilsarcosina, y Na-dodecilsulfato.

En otra realización, el ADN fetal es obtenido de una célula fetal, en donde dicha célula fetal se puede aislar de fuentes que incluyen, sin limitarse a sangre materna, sangre del cordón umbilical, vellocidad crioniónico, fluido amniótico, tejidos embrionarios y mucosa obtenida del cerviz o vagina de la madre.

En una realización preferida, las células fetales son aisladas de la sangre materna periférica. Se puede usar un anticuerpo específico para las células fetales para purificar las células fetales del suero materno (Mueller et al., *Lancet* 336: 197-200 (1990); Ganshirt-Ahlert et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166: 1350-1355 (1992)). También se pueden usar técnicas de

citometría de flujo para enriquecer las células fetales (Herzenberg et al., *PNAS* 76: 1453-1455 (1979); Bianchi et al., *PNAS* 87: 3279-3283 (1990); Bruch et al., *Prenatal Diagnosis* 11: 787-798 (1991)). La patente U.S. No. 5,432,054 también describe una técnica para la separación de glóbulos rojos nucleados fetales, usando un tubo que tiene un extremo ancho y un fondo angosto capilar hecho de polietileno. La centrifugación usando un programa de velocidad variable produce un amontonamiento de los glóbulos rojos en el capilar con base en la densidad de las moléculas. La fracción de densidad que contiene glóbulos rojos de baja densidad, incluyendo glóbulos rojos fetales, es recuperada y luego hemolizada diferencialmente para destruir preferencialmente los glóbulos rojos maternos. Se usa un gradiente de densidad en un medio hipertónico para separar los glóbulos rojos, ahora enriquecidos en glóbulos rojos fetales, de los linfocitos y de los glóbulos rojos maternos rotos. El uso de una solución hipertónica reduce los glóbulos rojos, que aumentan su densidad, y facilitan la purificación de los linfocitos más densos. Después que las células fetales han sido aisladas, el ADN fetal se puede purificar usando técnicas estándar de la técnica.

El ácido nucleico que será analizado puede ser un ácido nucleico e.g., genómico, plásmido, cósmido, cromosomas artificiales de levadura, ADN artificial o hecho por el hombre, incluyendo secuencias de ADN únicas, y también ADN que ha sido transcrito en reversa de una muestra de RNA, tal como cADN. La secuencia de RNA se puede determinar según la invención si es capaz de ser preparada en forma de ADN de doble cadena para ser usada como template de ADN.

Los términos "plantilla" y "plantilla oligonucleótida" son intercambiables cuando se usan para discutir un oligonucleótido que se recoge a un template y que se puede usar para preparar la síntesis de una copia de ese template.

ADN "amplificado" es ADN que ha sido "copiado" una o múltiples veces, e.g., mediante la reacción en cadena de polimerasa. Cuando una gran cantidad de ADN está disponible para ensayo, de forma que un número suficiente de copias de los sitios de interés ya están presentes en la muestra a ser ensayada, puede no ser necesario "amplificar" el ADN del sitio de interés en un número par de copias replicadas. Mejor, el simple "copiado" del template de ADN una vez, usando un juego de plantillas apropiado, que

puede contener estructuras de gancho que permiten que los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción sean de doble cadena, puede ser suficiente.

"Copia" como en "ADN copiado" se refiere a ADN que ha sido copiado una vez, o ADN que ha sido amplificado en más de una copia.

En una realización, el ácido nucleico es amplificado directamente en la muestra original que contiene la fuente de ácido nucleico. No es esencial que el ácido nucleico sea extraído, purificado o aislado; solo debe ser proveído en una forma que sea capaz de ser amplificado. La hibridación del template de ácido nucleico con plantilla, antes de la amplificación no se requiere. Por ejemplo, la amplificación se puede llevar a cabo en una célula o lisato de muestra usando protocolos estándar bien conocidos en la técnica. El ADN que está en un soporte sólido, en una preparación biológica fija, o de otra forma en una composición que contiene sustancias sin ADN, y que se puede amplificar sin ser primero extraída del soporte sólido o de la preparación fija o de las sustancias sin ADN en la composición, se pueden usar directamente sin purificación adicional, siempre que el ADN se pueda recocer con plantillas adecuadas y se pueda copiar, especialmente amplificar, y los productos copiados o amplificados pueden ser recuperados y usados como se describe aquí.

En una realización preferida, el ácido nucleico es extraído, purificado o aislado de materiales de ácido nucleico que están en la muestra original usando métodos conocidos en la técnica, antes de la amplificación.

En otra realización, el ácido nucleico es extraído, purificado o aislado de la muestra original que contiene la fuente de ácido nucleico y antes de la amplificación, el ácido nucleico es fragmentado usando cualquier número de métodos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a digestión enzimática, cortado manual y sonicación. Por ejemplo, el ADN puede ser digerido con una o más enzimas de restricción que tienen un sitio de reconocimiento, y especialmente un sitio de reconocimiento de par de base ocho o base seis, que no está presente en los sitios de interés. Típicamente, el ADN puede ser fragmentado en cualquier longitud deseada, incluyendo longitudes de pares de base 50, 100, 250, 500, 1,000, 5,000, 10,000, 50,000

y 100,000. En otra realización, el ADN es fragmentado a una longitud promedio de aproximadamente 1000 a 2000 pares de base. Sin embargo, no es necesario que el ADN esté fragmentado.

Los fragmentos de ADN que contienen los sitios de interés se pueden purificar del ADN fragmentado antes de la amplificación. Dichos fragmentos pueden ser purificados usando plantillas que se usarán en la amplificación (ver "Diseño de la Plantilla" en la sección siguiente) como ganchos para recobrar los sitios de interés, con base en la habilidad de dichas plantillas para reconocerse a los sitios de interés. En una realización preferida, se usan plantillas de marcador modificado, tales como e.g., plantillas biotintiladas.

La especificidad de la reacción de amplificación se puede mejorar mediante la purificación de los fragmentos de ADN que contienen los sitios de interés. Esto minimizará la amplificación de regiones no específicas del template de ADN. La purificación de los fragmentos de ADN también puede permitir múltiples PCR (Reacciones en cadena de polimerasa) o amplificación de múltiples sitios de interés con especificidad mejorada.

Los sitios de interés a ser secuenciados se pueden seleccionar con base en la sola secuencia. En los humanos se han descrito más de 1.42 millones de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) (*Nature* 409: 928-933 (2001); The SNP Consortium LTD). En promedio, hay un SNP cada 1.9 kb de genoma humano. Sin embargo, la distancia entre los sitios de interés no necesita ser considerada cuando se seleccionen los sitios de interés a ser secuenciados según la invención. Si más de un sitio de interés en ADN genómico está siendo analizado, los sitios de interés seleccionados pueden estar en el mismo cromosoma o en diferentes cromosomas.

En una realización preferida, los sitios de interés seleccionados pueden estar agrupados en una región particular de un cromosoma. Los sitios múltiples de interés pueden estar localizados en una región de ADN tal que incluso con cualquier ruptura o fragmentación de ADN, los sitios múltiples de interés permanecen enlazados. Por ejemplo, si el ADN es obtenido y se rompe por fuerzas naturales en fragmentos de 5 kb, los sitios múltiples de interés se pueden seleccionar dentro de las regiones de 5 kb. Esto permite que cada fragmento, como se midió por los sitios de interés

dentro del fragmento, sirva como una unidad experimental, y reducirá cualquier ruido experimental posible, al comparar los sitios de interés en cromosomas múltiples.

Los sitios de interés en un cromosoma pueden estar a cualquier distancia entre sí, incluyendo pero sin limitarse a pares de 10-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-500, 500-750, 750-1000, 1000-1500, 1500-2000, 2000-2500, 2500-3000, 3000-3500, 3500-4000, 4000-4500, 4500-5000, 5000-10,000 y más de 10,000 bases.

En una realización preferida, la longitud de secuencia que es ampliada es preferiblemente diferente para cada sitio de interés de forma que los sitios de interés puedan ser separados por tamaño.

De hecho, es una ventaja de la invención que no se tengan que utilizar plantillas que copian una secuencia de gen entera. Mejor, el sitio de interés copiado es preferiblemente solo una pequeña parte del gen total o una pequeña parte de una región no codificada de ADN. No hay ventaja de secuenciar el gen completo y esto puede aumentar el costo y demorar resultados. El secuenciamiento de solo las bases deseadas o sitios de interés maximiza la eficiencia total del método porque permite determinar la secuencia del máximo número de sitios de interés más rápidamente y con costo mínimo.

Debido a la gran cantidad de secuencias que se pueden analizar juntas, el método de la invención es especialmente posible para la detección a gran escala de un número de sitios de interés.

Usando el método de la invención se puede analizar y procesar cualquier número de sitios de interés, especialmente al mismo tiempo. La(s) muestra(s) se pueden analizar para determinar la secuencia en un sitio de interés o en múltiples sitios de interés al mismo tiempo. Los sitios de interés pueden estar presentes en un cromosoma simple o en múltiples cromosomas.

Alternativamente, se pueden analizar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50, 50-100, 100-250, 250-500, 500-1,000,

1,000-2,000, 2,000-3,000, 3,000-5,000, 5,000-10,000, 10,000-50,000 o más de 50,000 sitios de interés al mismo tiempo cuando se desea una detección genética global. Dicha detección genética global puede ser deseada cuando se usa el método de la invención para proveer una huella (fingerprint) genética para identificar un individuo o para genotipar el SNP.

El sitio de interés que será copiado puede estar dentro de una secuencia de codificación o fuera de una secuencia de codificación. Preferiblemente, uno o más sitios de interés a ser copiados están dentro de un gen. En una realización preferida, el template de ADN que será copiado es un sitio o sitios de interés que están dentro de una secuencia de codificación genómica, ya sea intrón o exón. En una realización altamente preferida, las secuencias de ADN exón son copiadas. Los sitios de interés pueden ser sitios en donde se conoce que las mutaciones causan enfermedades o predisponen a un estado de enfermedad. Alternativamente, los sitios de interés que serán copiados pueden estar fuera de la secuencia de codificación, por ejemplo, en una región regulatoria transcripcional, y especialmente una secuencia promotora, mejoradora o represora.

Método para determinar la Secuencia de un Sitio de interés

Se puede usar cualquier método que provea información sobre la secuencia de un ácido nucleico, incluyendo pero sin limitarse a PCR específica de alelo, PCR, espectrometría de masas, hibridación de espectrometría de masas MALDI-TOF, extensión de la plantilla, detección de fluorescencia, transferencia de energía de resonancia con fluorescencia (FRET), polarización de fluorescencia, secuenciamiento de ADN, secuenciamiento dideoxi de Sanger, geles de secuenciamiento de ADN, electroforesis capilar sobre en máquina de secuenciamiento de ADN automatizada. Electroforesis de microcanal, microformación, mancha del punto sur, manchas en canal, manchas punteadas y amplificación de ácido nucleico de plantilla lineal simple, como se describe en la Patente U.S. No. 6,251,639.

El método preferido para determinar la secuencia se ha descrito previamente en la Solicitud U.S. No. 10/093,618, radicada el 11 de Marzo de 2002, incorporada a este en su totalidad como referencia.

38

1. Diseño de la Plantilla

Se pueden usar secuencias publicadas, incluyendo secuencias de consenso, para diseñar o seleccionar las plantillas para uso en la amplificación del template de ADN. La selección de secuencias a ser usadas para la construcción de plantillas que flanquean un sitio de interés, se puede hacer mediante el examen de la secuencia del sitio de interés, o inmediatamente después de este. La secuencia publicada recientemente del genoma humano provee una fuente de información útil de secuencia de consenso a partir de la cual se diseñan plantillas para flanquear un sitio de interés deseado de un gen humano.

"Flanquear" un sitio de interés significa que las secuencias de las plantillas son tales que al menos una porción de la región 3' de una plantilla es complementaria en la dirección contraria de la cadena del template de ADN, y del sitio del sitio de interés (plantilla delantera), y al menos una porción de la región 3' de la otra plantilla es complementaria a la dirección de la cadena del template de ADN y aguas abajo del sitio de interés (plantilla reversa). Un "par de plantilla" significa un par de plantillas delanteras o reversas. Ambas plantillas de un par de plantilla se recocen de manera que permiten la extensión de las plantillas, de forma que la extensión produce un template de ADN amplificado en la región del sitio de interés.

Las plantillas se pueden preparar mediante una variedad de métodos que incluyen sin limitarse a la clonación de secuencias apropiadas y síntesis química directa usando métodos bien conocidos en la técnica (Narang *et al.*, *Methods Enzymol.* 68:90 (1979); Brown *et al.*, *Methods Enzymol.* 68:109 (1979)). Las plantillas también se pueden obtener de fuentes comerciales tales como Operon Technologies, Amersham Pharmacia Biotech, Sigma y Life Technologies. Las plantillas pueden tener una temperatura de fusión idéntica. Las longitudes de las plantillas se pueden extender o acortar en el extremo 5' o en el extremo 3' para producir plantillas con temperaturas de fusión deseadas. En una realización preferida, una de las plantillas del par de plantilla es más larga que la otra plantilla. En una realización preferida, las longitudes de recocido de 3' de las plantillas, dentro de un par de plantilla, son diferentes. Además, la posición de recocido de cada par de plantilla se puede

diseñar de forma que la secuencia y la longitud de los pares plantilla produzcan la temperatura de fusión deseada. La ecuación más sencilla para determinar la temperatura de fusión de las plantillas más pequeñas de pares de base 25 es la Regla de Wallace ($T_d = 2(A+T) + 4(G+C)$). También se pueden usar programas de computadora para diseñar plantillas, incluyendo pero sin limitarse al Array Designer Software (Arrayit Inc.), Oligonucleotide Probe Sequence Design Software for Genetic Analysis (Olympus Optical Co.), NetPrimer y ADNsia de Hitachi Software Engineering. La T_m (temperatura de fusión o de recocido) de cada plantilla se calcula usando programas de software tales como Net Primer (programa basado en web libre en <http://premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>; dirección de Internet a partir del 17 de Abril de 2002).

En otra realización, la temperatura de recocido de las plantillas se puede recalcular e incrementar en cualquier ciclo de amplificación, incluyendo pero sin limitarse al ciclo 1, 2, 3, 4, 5, ciclos 6-10, ciclos 10-15, ciclos 15-20, ciclos 20-25, ciclos 25-30, ciclos 30-35 o ciclos 35-40. Después de los ciclos iniciales de amplificación, la mitad 5' de las plantillas es incorporada a los productos de cada sitio de interés, de esta forma la T_m se puede recalcular con base tanto en las secuencias de la mitad 5' como en la mitad 3' de cada plantilla.

Por ejemplo, en la FIG. 1B, el primer ciclo de amplificación se realiza a aproximadamente la temperatura de recocido de la región 3', que se recoca al template de ADN de la segunda plantilla (región "c"), que es de 13 bases. Después del primer ciclo, la temperatura de recocido puede aumentar a TM_2 , que es aproximadamente la temperatura de fusión de la región 3', que se recoca al template de ADN de la primera plantilla, que se describe como región "b". La segunda plantilla no se puede ligar al template de ADN original porque solo se recoca a 13 bases en el template de ADN original, y TM_2 está cerca de la temperatura de fusión de aproximadamente 20 bases, que es la región de recocido de 3' de la primera plantilla (FIG. 1C). Sin embargo, la primera plantilla se puede ligar al ADN que fue copiado en el primer ciclo de la reacción. En el tercer ciclo, la temperatura de recocido sube a TM_3 , que está cerca de la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla, que se describe como regiones "c" y "d". El template de ADN producido en el segundo ciclo de PCR contiene ambas

regiones "c" y "d", y por lo tanto, la segunda plantilla se puede recocer y extender a TM3 (FIG. 1D). Los ciclos restantes son llevados a cabo a TM3. La secuencia entera de la primera plantilla (a + b') se recoce al template del tercer ciclo de PCR, y se extiende (FIG. 1E). El aumento en la temperatura de recocido disminuirá el ligamiento no específico, y aumentará la especificidad de la reacción, que es especialmente útil si se amplía un sitio de interés del ADN genómico humano, que es de aproximadamente 3×10^8 pares de base de longitud.

Como se usa aquí, el término "cerca de" con relación a las temperaturas de recocido se usa para abarcar temperaturas dentro de 10 grados centígrados de las temperaturas declaradas.

En una realización, un par plantilla se usa para cada sitio de interés. Sin embargo, se pueden usar múltiples pares plantilla para cada sitio de interés.

En una realización, las plantillas son diseñadas de forma que una o ambas plantillas del par plantilla contienen secuencia en la región 5' de uno o más endonucleasas de restricción (enzima de reacción).

Como se usa aquí, con relación a la posición en la cual las enzimas de restricción digieren el ADN, la "dirección" de la cadena es la cadena, leyendo de 5' a 3' en la dirección en la cual se corta la enzima de restricción.

Por ejemplo, BsmF I reconoce las siguientes secuencias:

5' GGGAGC(N) ₁₀ 3' (SEC ID No:1)	5' (N) ₁₄ GTCCC 3' (SEC ID No: 2)
3' CCCTG(N) ₁₄ 5'	3' (N) ₁₀ CAGGG 5'

La dirección de la cadena es la cadena que contiene la secuencia " GGAC" porque se lee 5' a 3' en la dirección en que la enzima de restricción se corta.

Como se usa aquí, con relación a la posición en la cual las enzimas de restricción digieren el ADN, la "dirección contraria" de la cadena, leyendo de 3' a 5', en la cual se corta la enzima de restricción.

64

En otra realización, una de las plantillas en el par plantilla está diseñada de forma que contiene un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para una enzima de restricción que se a corta "n" nucleótidos del sitio de reconocimiento, y produce un extremo 3' suspendido y una proyección 5' que contiene el sitio de interés (referido aquí como una "segunda plantilla"). "N" es la distancia desde el sitio de reconocimiento al sitio de corte de la enzima de restricción. En otras palabras, la segunda plantilla de un par plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que no corta el ADN en el sitio de reconocimiento sino a "n" nucleótidos del sitio de reconocimiento. Por ejemplo, si la secuencia de reconocimiento es para la enzima de restricción BceA I, la enzima cortará a diez (10) nucleótidos del punto de reconocimiento de la dirección de la cadena, y a doce (12) nucleótidos del sitio de reconocimiento de dirección contraria de la cadena.

La región 3' y preferiblemente, la mitad 3' de las plantillas está diseñada para recocerse a una secuencia que flanquea los sitios de interés (FIG. 1A). La segunda plantilla se puede recocer a cualquier distancia del sitio de interés siempre y cuando la digestión con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción de la primera plantilla genere una proyección 5' que contiene el sitio de interés. Las proyecciones 5' pueden ser de cualquier tamaño, incluyendo pero sin limitarse a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más de 14 bases desde el sitio de interés o en el sitio de interés.

En una realización preferida, la segunda plantilla está diseñada para recocerse más cerca del sitio de interés que la otra plantilla del par plantilla (la otra plantilla referida aquí como la "primera plantilla"). La segunda plantilla puede ser una plantilla delantera o reversa, y la primera plantilla puede ser una plantilla reversa o delantera, respectivamente. Si la primera o segunda plantilla es plantilla adelantada o reversa se puede determinar mediante el diseño que proveerá mejores resultados de secuenciamiento.

Por ejemplo, la plantilla que se recoce más cerca del sitio de interés puede contener un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I, que corta a diez (10) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la dirección

de la cadena, y a catorce (14) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la dirección contraria de la cadena. En este caso, la plantilla puede ser diseñada de forma que el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción está a 13 bases, 12 bases, 10 bases o 11 bases del sitio de interés. Si el sitio de reconocimiento está a 13 bases del sitio de interés, la digestión con BsmF I generará una proyección 5' (RXXX), en donde el sitio de interés (R) es el primer nucleótido en la proyección (leyendo 3' a 5'), y X es cualquier nucleótido. Si el sitio de reconocimiento está a 12 bases del sitio de interés, la digestión con BsmF I generará una proyección 5' (XRX), en donde el sitio de interés (R) está en el segundo nucleótido en la proyección (leyendo de 3' a 5').

Si el sitio de reconocimiento está a 11 bases del sitio de interés, la digestión con BsmF I generará una proyección 5' (XXRX), en donde el sitio de interés (R) está en el tercer nucleótido en la proyección (leyendo de 3' a 5'). La distancia entre el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción y el sitio de interés se debe diseñar de forma que la digestión con la enzima de restricción genere una proyección 5' que contiene el sitio de interés. La distancia efectiva entre el sitio de reconocimiento y el sitio de interés variará dependiendo de la elección de la enzima de restricción.

En otra realización, la plantilla que se recoce más cerca del sitio de interés, con relación a la otra plantilla, se puede diseñar de forma que la enzima de restricción que genera la proyección 5', que contiene el sitio de interés, se vea en la misma secuencia del sitio de corte, independiente del nucleótido en el punto del sitio de interés. Por ejemplo, si la plantilla que se rerecoce más cerca del sitio de interés es diseñada para que el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BsmF I (5' GGGAC 3') esté a trece bases del sitio de interés, la enzima de restricción cortará en la dirección contraria de la cadena a una base del sitio de interés. El nucleótido en el sitio de interés está adyacente al sitio de corte, y puede variar de molécula de ADN a molécula de ADN. Si se desea que los nucleótidos adyacentes al sitio de corte sean idénticos, la plantilla puede ser diseñada de forma que el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BsmF I esté a doce bases del punto del sitio de interés. La digestión con BsmF I generará una proyección 5', en donde el punto del sitio de interés está en la segunda posición de la proyección (leyendo 3' a 5') y ya no

está adyacente al sitio de corte. El diseño de la plantilla de forma que el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción está a doce (12) bases del sitio de interés permite que los nucleótidos adyacentes en el sitio de corte sean los mismos, independiente del nucleótido en el sitio de interés. Además, las plantillas que han sido diseñadas de forma que el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción BsmF I, esté a once (11) o diez (10) bases del sitio de interés permitirá que los nucleótidos adyacentes al sitio de corte sean los mismos, independiente del nucleótido en el sitio de interés. Se pueden usar estrategias similares de diseño de la plantilla con otras enzimas de restricción para que los nucleótidos adyacentes al sitio de corte sean iguales, independientes del nucleótido en los sitios de interés.

El extremo 3' de la primera plantilla (ya sea delantera o reversa) se puede diseñar para que se recosa a la distancia escogida en el sitio de interés. Preferiblemente, por ejemplo, esta distancia está entre 10-25, 25-50, 50-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000 y a más de 1000 bases del sitio de interés. Los sitios de recocido de las primeras plantillas son escogidos de forma que cada plantilla sucesiva aguas arriba esté más y más lejos de su respectiva plantilla aguas abajo.

Por ejemplo, si en un sitio de interés 1, los extremos 3' de la primera y segunda plantillas están a Z bases, entonces en el sitio de interés 2, los extremos 3' de las plantillas aguas arriba y aguas abajo están a Z+K bases, en donde K = 1, 2, 3, 4, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, 800-900, 900-1000, o más de 1000 bases (FIG 2). El propósito de hacer las plantillas más y más lejos de sus respectivas segundas plantillas es que los productos de PCR de todos los sitios de interés sean de diferente tamaño, y se puedan separar, e.g., en un gel de secuenciamiento. Esto permite la multiplexión mediante la recolección de los productos de PCR en pasos posteriores.

En una realización, la región 5' de la primera y segunda plantilla puede tener un sitio de reconocimiento para cualquier tipo de enzima de restricción. En una realización preferida, la región 5' de la primera y/o

segunda plantilla tiene al menos un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción que es diferente del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción que se usa para generar la proyección 5', que contiene el sitio de interés.

En una realización, la región 5' de la primera plantilla puede tener un sitio de reconocimiento para cualquier tipo de enzima de restricción. En una realización preferida, la primera plantilla tiene al menos un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción que es diferente del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción en la segunda plantilla. En otra realización preferida, la primera plantilla se recoge más lejos del sitio de interés que la segunda plantilla.

En una realización preferida, la segunda plantilla contiene una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción para una enzima de restricción Tipo IIS, que incluye pero sin limitarse a BcA I y BsmF I, que produce una proyección 5' de dos bases y una proyección 5' de cuatro bases respectivamente. Se prefieren las enzimas de restricción que son de Tipo IIS porque ellas reconocen secuencias base asimétricas (no palindrómicas como las enzimas Tipo IIS ortodox). Las enzimas de restricción Tipo IIS clivan el ADN en una posición especificada que está afuera del sitio de reconocimiento, típicamente hasta 20 pares de base fuera del sitio de reconocimiento.

Estas propiedades hacen que las enzimas de restricción Tipo IIS, y los sitios de reconocimiento de estas, sean específicamente útiles en el método de la invención. Preferiblemente, las enzimas de restricción Tipo IIS usadas en este método dejan una proyección 5' y un 3' suspendido.

Se conoce una amplia variedad de enzimas de restricción Tipo IIS y tales enzimas han sido aisladas de bacterias, fago, arqueabacteria y virus de algas eucarióticas y están disponibles comercialmente (Promega, Madison WI; New England Biolabs, Beverly, MA; Szybalski W. et al., Gene 100:13-26, 1991). Ejemplos de enzimas de restricción Tipo IIS que serían útiles en el método de la invención incluyen, sin limitarse a las listadas en la Tabla I.

Enzima-Fuente	Sitio de Reconocimiento /fragmentación	Proveedor
Alw I - <i>Aclinetobacter lwoffii</i>	GGATC(4/5)	NE Biolabs
Alw 26 I - <i>Aclinetobacter lwoffii</i>	GTCTC(1/5)	Promega
Bbs I - <i>Bacillus laterosporus</i>	GAAGAC(2/6)	NE Biolabs
Bbv I - <i>Bacillus brevis</i>	GCAGC(8/12)	NE Biolabs
BceA I - <i>Bacillus cereus</i> 1315	IACGGC(12/14)	NE Biolabs
Bmr I - <i>Bacillus megaterium</i>	CTGGG(5/4)	NE Biolabs
Bsa I - <i>Bacillus Stearothermophilus</i> 8-55	GGTCTC(1/5)	NE Biolabs
Bst71 I - <i>Bacillus Stearothermophilus</i> 71	GCAGC(8/12)	Promega
BamA I - <i>Bacillus Stearothermophilus</i> A884	GTCTC(1/5)	NE Biolabs
BamB I - <i>Bacillus Stearothermophilus</i> B81	CGTCTC(1/5)	NE Biolabs
BamF I - <i>Bacillus Stearothermophilus</i> F	GGGAC(10/14)	NE Biolabs
BspM I - <i>Bacillus species M</i>	ACCTGC(4/8)	NE Biolabs
Eae I - <i>Enterobacter aerogenes</i>	CTCTTC(1/4)	NE Biolabs
Fau I - <i>Flavobacterium aquatile</i>	CCCGC(4/6)	NE Biolabs
Fok I - <i>Flavobacterium okeanokolus</i>	GGATG(9/13)	NE Biolabs
Hga I - <i>Haemophilus gallinarum</i>	GACGC(5/10)	NE Biolabs
Ple I - <i>Pseudomonas lemoignei</i>	GAGTC(4/5)	NE Biolabs
Sap I - <i>Saccharopolyspora species</i>	GCTCTTC(1/4)	NE Biolabs
SpeN I - <i>Streptococcus faecalis</i> ND547	GCATC(5/8)	NE Biolabs
Sti 132 I - <i>Streptococcus thermophilus</i> STI 32	CCCG(4/8)	No hay proveedor comercial (Gen 195:201-206 (1997))

En una realización, un par plantilla tiene secuencia en la región 5' de cada una de las plantillas que provee un sitio de reconocimiento de enzima de restricción que es único para una enzima de restricción.

En otra realización, un par plantilla tiene secuencia en la región 5' de cada una de las plantillas que provee un sitio de restricción que es reconocido por más de una enzima de restricción, y especialmente por más una enzima de restricción de Tipo IIS. Por ejemplo, ciertas secuencias de consenso pueden ser reconocidas por más de una enzima. Por ejemplo, BsgI, Eco571 y Bpml, todas reconocen el consenso (G/C)TGnAG y se clivan a 16 en la dirección contraria a la cadena, y a 14 en la dirección de la cadena. Una plantilla que provee dicha secuencia de consenso produciría un producto que tiene un sitio que puede ser reconocido por cualquiera de las enzimas de restricción BsgI, Eco571 y Bpml.

Otras enzimas de restricción que cortan el ADN a una distancia del sitio de reconocimiento, y producen un extremo suspendido 3' y una proyección 5' incluyen las enzimas de restricción Tipo IIS.

Por ejemplo, la enzima de restricción EcoP15I reconoce la secuencia 5'CAGCAG 3' y se cliva 25 bases aguas abajo en la dirección de la cadena y 27 bases en la dirección contraria de la cadena. Será adicionalmente apreciado por la persona de conocimiento común en la técnica, que nuevas enzimas de restricción sean descubiertas y fácilmente adaptables para uso en el objeto de la invención.

En otra realización, la segunda plantilla puede contener una porción de la secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción, en donde el sitio completo de reconocimiento para la enzima de restricción se genera al momento de la amplificación del template de ADN de forma que la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés. Por ejemplo, el sitio de reconocimiento para BsmF I es 5' GGGACN₁₀13' (SEC ID No: 1). La región 3', que se recoca al template de ADN, de la segunda plantilla puede terminar con los nucleótidos "GCG", que no tienen que ser complementarios con el template de ADN. Si la región de recocido de 3' está a cerca de 10-20 bases, incluso si las últimas tres bases no se recocen, la plantilla se extenderá y generará un sitio BsmF I.

Segunda plantilla: 5' GGAAATTCCATGATGCGTGGG → (SEC ID No: 3)

Template de ADN: 3' GGAAATTCCATGATGCCTN₁,N₂,N₃,AC 3' (SEC ID No:4)

La segunda plantilla se puede diseñar para recocerse al template de ADN, en donde las siguientes dos bases del template de ADN son timidina y guanina, de forma que una adenosina y citosina son incorporadas en la plantilla formando un sitio de reconocimiento para BsmF I, 5' GGGACN₁₀13' (SEC ID No: 1). La segunda plantilla se puede diseñar para recocerse de forma que la digestión con BsmF I genere una proyección 5' que contiene el sitio de interés.

En otra realización, la segunda plantilla puede contener un sitio de reconocimiento entero o total para una enzima de restricción, o una porción

~~62~~

de un sitio de reconocimiento, que genera un sitio de reconocimiento total a la replicación dependiente de la plantilla, del template de ADN, de forma que la digestión con una enzima de restricción corta en el sitio de restricción y genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés. Por ejemplo, la enzima de restricción BsaI se liga a los siguientes sitios de reconocimiento: 5' C¹CN₁N₂GG 3'. La segunda plantilla se puede diseñar de forma que la región 3', que se recoce al template de ADN de la plantilla termina con "CC", el SNP de interés está representado por "N₁", y la secuencia template aguas abajo del SNP es "N₂GG".

Segunda plantilla: 5' GGAAATTCCATGATGCGTACC→ (SEC ID No: 5)

Template de ADN: 3' CCTTTAAGGTACTACGCATGGN₁N₂CC 5' (SEC ID No:28)

5' GGAAATTCCATGATGCCTACCN₁,N₂,GG 3' (SEC ID No: 6)

Después de la digestión con BsaI, se generaría una proyección 5' de la siguiente secuencia:

5' C 3'
3' GGN₁N₂CC 5'

Si el nucleótido guanina no es reportado en el sitio de interés, el extremo 3' suspendido se puede llenar con citosina no marcada, que es complementaria al primer nucleótido en la proyección. Después de remover el exceso de citosina, se pueden usar ddNTPs para llenar el siguiente nucleótido, N₁, que representa al sitio de interés. Se pueden usar otras enzimas de restricción que incluyen sin limitarse a BssK I (5' ¹CCNGG 3' (SEC ID No: 7), Dde I (5' C¹TNAG 3'), EcoN I (5' CCTNN¹NNNAGG 3'), Fnu4H I (5' GC¹NGC 3'), Hinf I (5' G¹ANTC 3'), PfiF I (5' GACN¹NNGTC 3').

No es necesario que la región 3', que se recoce al template de ADN, de la segunda plantilla sea 100% complementario al template de ADN. Por ejemplo, los últimos 1, 2, o 3 nucleótidos del extremo 3' de la segunda plantilla puede no estar conjugado con el template de ADN. La región de la plantilla que se recoce al template de ADN apuntará a la plantilla, y dejará que la plantilla se extienda. Incluso si los dos últimos nucleótidos no son complementarios al template de ADN, la plantilla se extenderá y generará un sitio de reconocimiento de enzima de restricción. Por ejemplo, los dos nucleótidos en la segunda plantilla son "CC". La segunda plantilla se recoce

al template de ADN y permite la extensión incluso si "CC" no es complementario al nucleótido Na y Nb del template de ADN.

Segunda plantilla: 5' GGAAATTCCATGATGCGTACC→ (SEC ID No: 5)

Template de ADN: 3' CCTTTAAGGTACTACGCATN_aN_bN₁N₂CC 5' (SEC ID No:29)

Después de la digestión con BsaJ I, se generaría una proyección 5' de la siguiente secuencia:

5' C 3'
3' GGN₁N₂CC 5'

Si el nucleótido guanina no es reportado en el sitio de interés, la proyección 5' se puede llenar con citosina no marcada. El exceso de citosina se puede enjuagar, y llenar con ddNTPs marcados. El primer nucleótido incorporado (N₁') corresponde al sitio de interés. Si se reporta guanina en el sitio de interés, los sitios de interés se pueden llenar con citosina no marcada y se puede detectar un nucleótido aguas abajo de los sitios de interés. Por ejemplo, asumir que N₂ es adenina.

Si el sitio de interés es guanina, se puede usar citosina no marcada para la reacción de llenado. Después de remover la citosina, se puede usar una reacción de llenado con timidina marcada. La timidina marcada será incorporada solo si el sitio de interés es guanina. De este modo, la secuencia del sitio de interés se puede determinar mediante la detección de un nucleótido aguas abajo del sitio de interés.

En otra realización, la primera y segunda plantilla contienen una porción de una secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción, en donde el sitio de reconocimiento total para la enzima de restricción se genera a la amplificación del template de ADN, de forma que la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés. El sitio de reconocimiento de cualquier enzima de restricción que contiene uno o más nucleótidos variables se puede generar con las enzimas de restricción que incluyen, pero sin limitarse a las enzimas de restricción BssK I (5' ¹CCNGG 3'), Dde I (5' C¹TNAG 3'), EcoN I (5' CCTNN↓NNNAGG 3' (SEC ID No: 7), Fnu4H I (5' GC¹NGC 3'), Hinf I (5' G¹ANTC 3'), PflF I (5'

GACN^INNGTC 3'), Sau96 (5' G^IGNCC 3'), ScaF I (5' CC^INGG 3'), y Tth1 11I (5' GACN^INNGTC 3').

En una realización preferida, las regiones 3' de la primera y segunda plantilla contienen la secuencia parcial para una enzima de restricción, en donde la secuencia parcial contiene 1, 2, 3, 4 o más de 4 disparidades con el template de ADN; estas disparidades crean el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción. El número de disparidades que se pueden tolerar en el extremo 3' depende de la longitud de la plantilla. Por ejemplo, si el sitio de interés está representado por N₁, se puede diseñar una primera plantilla que sea complementaria al template de ADN, descrito más adelante como región "a". La región 3' de la primera plantilla termina con "CC", que no es complementaria al template de ADN. La segunda plantilla está diseñada para ser complementaria al template de ADN, que está descrito más adelante como región "b". La región 3' de la segunda plantilla termina con "CC", que no es complementaria al template de ADN.

Primera Plantilla	5' <u> a </u> CC→
Template de ADN	3' <u> a' </u> AAN ₁ ,N ₂ ,TT <u> b' </u> 5'
	5' <u> a </u> TTN ₁ ,N ₂ ,AA <u> b </u> 3'
	← CC <u> b' </u> 5'segunda plantilla

Después de una ronda de amplificación se generarían los siguientes productos:

	5' <u> a </u> CCN ₁ ,N ₂ ,AA <u> b </u> 3'
y	
	5' <u> b </u> CCN ₂ ,N ₁ ,AA <u> a' </u> 3'

En el ciclo dos, las plantillas se pueden recocer a los templates que se generaron en el primer ciclo de PCR:

5' <u> a </u> CCN ₁ ,N ₂ ,AA <u> b </u> 3'
← CC <u> b' </u> 5'
← CC <u> a </u> 5'
5' <u> b' </u> CCN ₂ ,N ₁ ,AA <u> a' </u> 3'

Después del ciclo dos de PCR, se generaría los siguientes productos:

5' a CCN₁N₂GG b 3'

3' a' GGN₁N₂CC b' 5'

El sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BsaJ I es generado, y después de la digestión con BsaJ I, se crea una proyección 5' que contiene el sitio de interés. El sitio de interés se puede detectar como se describe detalladamente a continuación.

En otra realización, un par plantilla tiene secuencia en la región 5' de cada uno de las plantillas que provee dos o más sitios de restricción que son reconocidos por dos o más enzimas de restricción.

En una realización más preferida, el par plantilla tiene diferentes sitios de reconocimiento de enzima de restricción en la región 5', especialmente en los extremos 5', de forma que se requiere una enzima de restricción diferente para segmentar cualquier secuencia indeseada. Por ejemplo, la primera plantilla para el sitio de interés "A" puede contener secuencia reconocida por una enzima de restricción "X", que puede ser cualquier tipo de enzima de restricción, y la segunda plantilla para el sitio de interés "A", que se reconoce más cerca al sitio de interés, puede contener secuencia para una enzima de restricción "Y", que es una enzima de restricción Tipo IIS que se corta a "n" nucleótidos y deja una proyección 5' y un extremo 3' suspendido. La proyección 5' contiene el sitio de interés. Después del ligamiento del ADN amplificado a los agujeros recubiertos de estreptavidina, se puede digerir con la enzima "Y", luego llenar con nucleótidos marcados y enjuagar, y luego digerir con la enzima de restricción "X", que liberará el fragmento de ADN que contiene el sitio de interés de la matriz sólida. El sitio de interés se puede analizar mediante la detección del nucleótido marcado que fue "llenado" en el sitio de interés, e.g., el sitio SNP.

En otra realización, las segundas plantillas para los diferentes sitios de interés que serán amplificados según la invención, contienen secuencia de reconocimiento en las regiones 5' para la misma enzima de restricción y

asimismo, todas las primeras plantillas también contienen el mismo sitio de reconocimiento de enzima de restricción, que es una enzima diferente de la enzima que reconozca a las segundas plantillas.

En otra realización, las segundas plantillas para los múltiples sitios de interés que serán amplificados según la invención, contienen secuencias de reconocimiento de enzima de restricción en las regiones 5' para las diferentes enzimas de reconocimiento.

En otra realización, las primeras plantillas para los múltiples sitios de interés que serán amplificados según la invención, contienen secuencias de reconocimiento de enzima de restricción en las regiones 5' para las diferentes enzimas de reconocimiento. Las secuencias de enzima de restricción múltiples proveen una oportunidad para influenciar el orden en el cual los sitios de interés recolectados son liberados del soporte sólido. Por ejemplo, si 50 sitios de interés son amplificados, las primeras plantillas pueden tener un marcador al final del extremo 5' para ayudar a la purificación, y un sitio de reconocimiento de enzima de restricción, y las segundas plantillas pueden contener un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción Tipo IIS. Por ejemplo, varias de las primeras plantillas pueden contener un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para EcoR I, las otras primeras plantillas pueden tener un sitio de reconocimiento para Pst I, y aún otras primeras plantillas pueden tener un sitio de reconocimiento para BamH I. Después de la amplificación, los sitios de interés se pueden enlazar a un soporte sólido con la ayuda de un marcador en las primeras plantillas. Llevando a cabo la restricción, se digiere una enzima de restricción a la vez, y se pueden liberar serialmente los sitios de interés amplificados. Si la primera digestión se realiza con EcoR, los sitios de interés amplificados con las primeras plantillas que contienen los sitios de reconocimiento para EcoR I serán liberados, y recolectados mientras que los otros sitios de interés permanecen enlazados al soporte sólido. Los sitios de interés amplificados se pueden liberar selectivamente del soporte sólido mediante la digestión con una enzima de restricción a la vez. El uso de diferentes sitios de enzima de restricción en las primeras plantillas permite que un gran número de sitios de interés sea amplificado en un tubo de reacción simple.

En una realización preferida, cualquier región 5' del sitio de digestión de la enzima de restricción de cada plantilla se puede modificar con un grupo funcional que provee la manipulación, procesamiento, identificación y/o purificación del fragmento. Ejemplos de dichos grupos funcionales, o marcadores, incluyen sin limitarse a biotina, derivados de biotina, carbohidratos, haptenos, colorantes, moléculas radiactivas, anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos, péptidos y moléculas inmunogénicas.

En otra realización, el template de ADN puede ser replicado una vez, sin ser amplificado más de una vuelta simple de replicación. Esto es útil cuando hay una gran cantidad de ADN disponible para análisis, porque un gran número de copias de los sitios de interés ya están presentes en la muestra, y no se necesitan copias adicionales. En esta realización, Las plantillas son diseñadas preferiblemente para que contengan una estructura de "gancho" en la región 5', de forma que la secuencia se doble y se cosa a una secuencia interna a sí misma de una forma complementaria. Cuando el template de ADN está replicado solo una vez, la secuencia de ADN que comprende el sitio de reconocimiento sería de cadena simple si no es para la estructura de "gancho". Sin embargo, en presencia de la estructura de gancho, esa región es efectivamente de doble cadena, provyendo de esta forma un sustrato de doble cadena para la actividad mediante las enzimas de restricción.

En la medida en que las condiciones de reacción sean compatibles, todos los pares plantillas para analizar un sitio o sitios de interés de ADN se pueden mezclar para usar en el método de la invención. En una realización preferida, todos los pares plantillas están mezclados con el template de ADN en un recipiente de reacción simple. Tal recipiente de reacción puede ser, por ejemplo, un tubo de reacción, o un agujero de una placa microtituladora.

Alternativamente, para evitar la competencia de los nucleótidos y para minimizar que la plantilla se dimerice y dificulte las temperaturas de recocido de las plantillas, cada sitio de interés o pequeños grupos de sitios de interés se puede amplificar en tubos o agujeros de reacción separados, y los productos se pueden recolectar posteriormente si se desea. Por ejemplo, las reacciones separadas se pueden recolectar en un recipiente de reacción simple antes de la digestión con la enzima de restricción que genera una

proyección 5', que contiene el sitio de interés o el sitio SNP, y un extremo 3' suspendido. Preferiblemente, Las plantillas de cada par de plantilla se proveen en cantidades equimolares. Además, especialmente preferido, cada uno de los diferentes pares de plantilla se provean en cantidades equimolares relativas a los otros pares que se están usando.

En otra realización, se pueden usar combinaciones de pares plantilla que permiten la amplificación eficiente de sus respectivos sitios de interés (ver e.g., FIG. 2). Dichas combinaciones se pueden determinar antes de usarlas en el método de la invención. Se pueden usar placas multi-agujero y máquinas de PCR para seleccionar los pares plantilla que trabajan eficientemente con otro. Por ejemplo, las máquinas de PCR de gradiente, tal como la máquina de PCR de gradiente Eppendorf Mastercycler®, se puede usar para seleccionar la temperatura de recocido óptima para cada par plantilla. Los pares plantilla que tienen propiedades similares se pueden usar juntos en un tubo de reacción simple.

En otra realización, se puede usar un contenedor de muestras múltiples que incluye, pero sin limitarse, a una placa de 96 agujeros o más, para amplificar un sitio de interés simple con los mismos pares de plantillas, de muestras de template de ADN con condiciones de PCR óptimas para ese sitio de interés. Alternativamente, se puede usar un contenedor de muestras múltiples separado para la amplificación de cada sitio de interés, y los productos de cada muestra de template de ADN se pueden recolectar posteriormente. Por ejemplo, un gen A de 96 muestras diferentes de ADN se puede amplificar en placa microtituladora 1, un gen B de 96 muestras diferentes de ADN se puede amplificar en placa microtituladora 2, etc., y los productos de amplificación se pueden luego recolectar.

El resultado de la amplificación de los sitios de interés múltiples es una preparación que contiene productos PCR representativos que tiene la secuencia de cada sitio de interés. Por ejemplo, si el ADN de solo un individuo se usa como template de ADN, y si cientos de sitios de interés relacionados con enfermedad son amplificados del template de ADN, el ADN amplificado sería una mezcla de pequeños productos de PCR de cada uno de los sitios de interés. Dicha preparación podría ser analizada adicionalmente en ese momento para determinar la secuencia de cada sitio

de interés o solo en algunos sitios de interés. Adicionalmente, la preparación podría almacenarse de forma que el ADN se conserve y pueda ser analizado después. La información contenida en el ADN amplificado se puede revelar mediante cualquier método adecuado incluyendo, pero sin limitarse a la detección de fluorescencia, secuenciamiento, electroforesis en gel y espectrometría de masas (ver "Detección del Nucleótido Incorporado" en la siguiente sección).

II. Amplificación de los sitios de interés

El template de ADN se puede amplificar usando un método adecuado conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a PCR (Reacción en cadena de polimerasa), 3SR (reacción de secuencia auto-sostenida), LCR (reacción en cadena de ligasa), RACE-PCR (amplificación rápida de los extremos cADN), PLCR (una combinación de reacción en cadena de polimerasa y reacción en cadena de ligasa), amplificación de fago Q-beta (*Shah et al., J. Medical Micro. 33:1435-41 (1995)*), SDA (amplificación de desplazamiento de cadena), SOE-PCR (empalme de superposición por extensión de PCR) y similares. Estos métodos se pueden usar para diseñar variaciones de la plantilla liberable mediada de la reacción de amplificación cíclica descrita explícitamente en esta solicitud. En la realización más preferida, el template de ADN es amplificado usando PCR (PCR: A Practical Approach, M.J. McPherson, et al., IRL Press (1991); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis, et al., Academia Press (1990); y PCR technology: Principals and Applications of ADN Amplification, H.A. Erlich, Stockton Press (1989)). La PCR también está descrita en numerosas patentes U.S., incluyendo Pat. U.S. Nos. 4,683,195; 4,683,202; 4,800,159; 4,965,188; 4,889,818; 5,075,216; 5,079,352; 5,104,792; 5,023,171; 5,091,310 y 5,066,584.

Los componentes de una reacción de PCR típica incluyen, pero no se limitan a template de ADN, plantillas, un buffer de reacción (dependiente de la selección de polimerasa), dNTPs (dATP, dTTP, dGTP y dCPT) y una polimerasa de ADN. Se pueden diseñar y preparar plantillas de PCR adecuados como se discutió anteriormente (ver "Diseño de la Plantilla" sección anterior). Brevemente, la reacción se calienta a 95°C por 2 min., para separar las cadenas del template de ADN, la reacción es enfriada a una

temperatura apropiada (determinada mediante el cálculo de la temperatura de recocido de las plantillas diseñadas) que permita a las plantillas recocerse al templete de ADN, y es calentada a 72°C por dos minutos para permitir la extensión.

En una realización preferida, la temperatura de recocido es incrementada en cada uno de los tres ciclos de amplificación para reducir la amplificación no específica. Ver también Ejemplo 1 siguiente. La TM1 del primer ciclo de PCR está cerca de la temperatura de fusión de la región 3' de la segunda plantilla que se recoce al templete de ADN. La temperatura de recocido puede aumentar en los ciclos 2-10, preferiblemente en el ciclo 2, a TM2, que está cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recoce al templete de ADN de la primera plantilla. Si la temperatura de recocido aumenta en el ciclo 2, la temperatura de recocido permanece aproximadamente igual hasta al siguiente incremento de la temperatura de recocido. Finalmente, en cualquier ciclo subsiguiente al ciclo en el que la temperatura de recocido aumentó a TM2, preferiblemente el ciclo 3, la temperatura de recocido aumenta a TM3, que está cerca de la temperatura de fusión de la segunda plantilla entero. Después del tercer ciclo, la temperatura de recocido de los ciclos restantes puede estar cerca de TM3 o puede aumentar adicionalmente. En este ejemplo, la temperatura de recocido se incrementa en los ciclos 2 y 3. Sin embargo, la temperatura de recocido puede aumentar desde una temperatura de recocido baja en el ciclo 1, a una temperatura de recocido alta en el ciclo 2, sin ningún aumento adicional de temperatura, o la temperatura de recocido puede cambiar progresivamente de una temperatura de recocido baja a una temperatura de recocido alta en cualquier número de pasos incrementales. Por ejemplo, la temperatura de recocido se puede cambiar en los ciclos 2, 3, 4, 5, 6, etc.

Después del recocido, la temperatura en cada ciclo aumenta en una temperatura de "extensión" que permite que las plantillas se "extiendan" y luego, después de la extensión, la temperatura de cada ciclo aumenta a la temperatura de desnaturalización. Para los productos de PCR de pares de menos de 500 bases de tamaño se puede eliminar el paso de extensión de cada ciclo y solo tener los pasos de desnaturalización y recocido. Una reacción de PCR típica consiste en la desnaturalización, recocido y extensión de 25-45 ciclos, como se describió anteriormente. Sin embargo,

como se notó anteriormente, un ciclo de extensión (una copia) puede ser suficiente para practicar la invención.

En otra realización, se pueden usar juegos múltiples de pares en donde un juego de pares comprende una plantilla delantera y una plantilla reversa, para amplificar el templete de ADN para 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, o más de 20 ciclos, y luego el producto amplificado es amplificado adicionalmente en una reacción con un juego de plantilla simple o un subconjunto de múltiples juegos de plantillas. En una realización preferida, se usa una concentración baja de cada juego de plantilla para minimizar la formación de dimerización de la plantilla. Una baja concentración de ADN de partida se puede amplificar usando múltiples juegos de plantillas. Se puede usar cualquier número de juegos de plantilla en la primera reacción de amplificación, incluyendo pero sin limitarse a 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-1000 y más de 1000. En otra realización, el producto amplificado es amplificado adicionalmente con un subconjunto de los pares de plantillas múltiples, incluyendo pero sin limitarse a 2-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-150, 150-200, 200-250 y más de 250.

Los juegos de plantilla múltiples amplificarán los sitios de interés, de forma que una cantidad mínima de templete de ADN no está limitando el número de sitios de interés que se pueden detectar. Por ejemplo, si el templete de ADN es aislado de una célula simple, o el templete de ADN se obtiene de una hembra embarazada, que contiene tanto templete de ADN materno como templete de ADN fetal, se pueden usar bajas concentraciones de cada juego de plantilla en una primera reacción de amplificación para amplificar los sitios de interés. La baja concentración de plantillas reduce la formación de dimerización de la plantilla y aumenta la probabilidad que las plantillas se cosan al templete de ADN y permitan que la polimerasa se extienda. El número óptimo de ciclos realizados con los juegos de plantillas múltiples se determina por medio de la concentración de las plantillas. Siguiendo la primera reacción de amplificación, se pueden agregar plantillas adicionales para amplificar adicionalmente los sitios de interés. Las cantidades adicionales de cada juego de plantilla se pueden agregar y amplificar adicionalmente en una reacción simple. Alternativamente, el

producto amplificado se puede amplificar adicionalmente usando un juego de plantilla simple en cada reacción, o un subconjunto de los juegos de plantillas múltiples. Por ejemplo, si se usaran 150 juegos de plantillas en la primera reacción de amplificación, se pueden usar subconjuntos de 10 juegos de plantillas para amplificar adicionalmente el producto de la primera reacción.

Se puede usar cualquier polimerasa de ADN que cataliza la extensión de la plantilla que incluye pero sin limitarse a ADN polimerasa E. coli, fragmento Klenow de ADN polimerasa I E. coli, ADN polimerasa T7, ADN polimerasa T4, polimerasa Taq, ADN polimerasa ADN Pfu, ADN polimerasa Vent, bacteriofago 29, ADN polimerasa Genomic REDTaq™ o secuenasa. Preferiblemente, se usa una ADN polimerasa termoestable. También se puede realizar una PCR de "inicio caliente", en donde la reacción es calentada a 95°C por dos minutos antes de la adición de la polimerasa, o la polimerasa puede mantenerse inactiva hasta el primer paso de calentamiento del ciclo 1. La PCR de "inicio caliente" se puede usar para minimizar la amplificación no específica. Se puede usar cualquier número de ciclos de PCR para amplificar el ADN, que incluye pero sin limitarse a 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 45 ciclos. En una realización más preferida, el número de ciclos de PCR se realiza de forma que se produzcan cantidades equimolares de cada sitio de interés.

III. Purificación del ADN amplificado

La purificación del ADN amplificado no es necesaria para practicar la invención. Sin embargo, en una realización, si se prefiere la purificación, el extremo 5' de la plantilla (primera o segunda plantilla) puede ser purificado con un marcador que facilita que facilita la purificación de los productos de PCR. En una realización preferida, la primera plantilla es modificada con un marcador que facilita la purificación de los productos de PCR. La modificación es preferiblemente la misma para todas las plantillas, aunque se pueden usar diferentes modificaciones si se desea separar los productos de PCR en grupos diferentes.

El marcador puede ser un radioisótopo, molécula informadora fluorescente, molécula informadora quimiluminescente, anticuerpo,

fragmento de anticuerpo, hapteno, biotina, derivado de biotina, fotobiotina, iminobiotina, digoxigenina, avidina, enzima, acridinio, azúcar, enzima, apoenzima, oligonucleótido homopolimérico, hormona, mitad ferromagnética, mitad paramagnética, mitad diamagnética, mitad fosforescente, mitad luminescente, mitad electroquimiluminescente, mitad cromática, mitad que tiene una resonancia detectable de giro de electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductividad eléctrica o combinaciones de estos

Como un ejemplo, los extremos 5' de las plantillas pueden estar biotintilados (Kandpal *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 18:1789-1795 (1990); Kaneoka *et al.*, *Biotechniques* 10:30-34 (1991); Green *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 18:6163-6164 (1990)). La biotina provee un marcador de afinidad que se puede usar para purificar el ADN copiado del ADN genómico o de cualquiera otras moléculas de ADN que no son de interés. Las moléculas biotintiladas se pueden purificar usando una matriz recubierta de estreptavidina como se muestra en la FIG. 1F, que incluye pero sin limitarse, a placas Streptawell transparentes de Alto Enlace, de Roche Molecular Biochemicals (número de catálogo 1 645 892, como se lista en Roche Molecular Biochemicals, Catálogo de Bioquímicos 2001).

El producto de PCR de cada sitio de interés se coloca en agujeros separados de una placa recubierta de estreptavidina. Alternativamente, los productos de PCR de los sitios de interés se pueden recolectar y colocar en una matriz recubierta de estreptavidina, que incluye pero sin limitarse a placas Streptawell transparente de Alto Enlace, de Roche Molecular Biochemicals (número de catálogo 1 645 692, como se lista en Roche Molecular Biochemicals, Catálogo de Bioquímicos 2001).

El ADN amplificado también se puede separar del template de ADN usando métodos de no afinidad conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida usando protocolos estándar.

IV. Diseño del ADN amplificado

El ADN amplificado se puede digerir con una enzima de restricción que reconoce una secuencia que se ha proveído en la primera o segunda plantilla, usando protocolos estándar conocidos en la técnica (FIGS. 6A-6D).

Las digestiones de la enzima de restricción se realizan usando protocolos estándar bien conocidos en la técnica. La enzima usada depende del sitio de reconocimiento de restricción generado con la primera o segunda plantilla. Ver sección "Diseño de la Plantilla" anterior, para los detalles de los sitios de reconocimiento de restricción generados en las plantillas.

Las enzimas de restricción Tipo IIS son extremadamente útiles porque ellas se cortan a aproximadamente 10-20 pares base fuera del sitio de reconocimiento. Preferiblemente, las enzimas de restricción Tipo IIS son las que generan una proyección 5' y un extremo 3' suspendido, incluyendo pero sin limitarse a BceA I y BsmF I (ver e.g., Tabla 1). En una realización más preferida, la segunda plantilla (ya sea delantera o reversa) contiene una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción para BsmF I o BceA I. La enzima de restricción Tipo IIS BsmF I reconoce la secuencia de ácido nucleico GGGAC, y se corta a 14 nucleótidos del sitio de reconocimiento en la dirección contraria de la cadena y a 10 nucleótidos del sitio de reconocimiento en la dirección de la cadena. La digestión con BsmF I genera una proyección 5' de cuatro (4) bases.

Por ejemplo, si la segunda plantilla está diseñada para que, después de la amplificación, el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción esté a 13 bases del sitio de interés, luego después de la digestión, el sitio de interés está en la primera base en la proyección 5' (leyendo de 3' a 5'), y el extremo 3' suspendido está a una base del sitio de interés. El extremo 3' suspendido se puede llenar con un nucleótido que es complementario al sitio de interés. Una base de la proyección se puede llenar usando dideoxinucleótidos. Sin embargo, se pueden llenar 1, 2, 3 o 4 bases de la proyección usando deoxinucleótidos o una mezcla de dideoxinucleótidos y deoxinucleótidos.

La enzima de restricción BsmF I corta el ADN a diez (10) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la dirección de la cadena, y catorce (14) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la dirección contraria de la cadena. Sin embargo, de una manera dependiente de la secuencia, la enzima de restricción también corta a once (11) nucleótidos del punto de reconocimiento en la dirección de la cadena, y a quince (15) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la dirección contraria de la cadena. Así, existen

dos poblaciones de moléculas de ADN después de la digestión: moléculas de ADN cortadas a 10/14 y moléculas de ADN cortadas a 11/15. Si el sitio de reconocimiento de BsmF I está a 13 bases del sitio de interés en el producto amplificado, entonces las moléculas de ADN cortadas en la posición 11/15 generarán una proyección 5' que contiene el sitio de interés en la segunda posición de la proyección (leyendo de 3' a 5'). El extremo 3' suspendido de las moléculas de ADN se puede llenar con nucleótidos marcados. Por ejemplo, si se usan dideoxynucleótidos marcados, el extremo 3' suspendido de las moléculas cortadas a 11/15 sería llenado con una base, que corresponde a la base del sitio de interés, y el extremo 3' suspendido de las moléculas cortadas a 10/14 serían llenados con una base, que corresponde al sitio de interés. Las moléculas de ADN que han sido cortadas en la posición 10/14 y las moléculas de ADN que han sido cortadas en la posición 11/15 se pueden separar por tamaño, y se pueden detectar los nucleótidos incorporados. Esto permite la detección del nucleótido antes del sitio de interés, la detección del sitio de interés, y potencialmente las tres bases después del sitio de interés.

Alternativamente, si la base del sitio de interés y el sitio de interés son nucleótidos diferentes, entonces el extremo 3' suspendido de las moléculas cortadas en 11/15 se puede llenar con deoxynucleótido que es complementario a la base aguas arriba. El deoxynucleótido restante es lavado, y el sitio del sitio de interés se puede llenar ya sea con deoxynucleótidos marcados, deoxynucleótidos no marcados, dideoxynucleótidos marcados, o dideoxynucleótidos no marcados. Después de la reacción de llenado, el nucleótido se puede detectar mediante cualquier método adecuado. De esta forma, después de la primera reacción de llenado con dNTP, el extremo 3' suspendido de las moléculas cortadas a 10/14 y 11/15 es del sitio de interés. El extremo 3' suspendido ahora puede ser llenado una base, que corresponde al sitio de interés, dos bases, tres bases o cuatro bases.

La enzima de restricción BceA I reconoce la secuencia ACGGC de ácido nucleico y se corta a 12 (doce) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la dirección de la cadena, y a 15 (catorce) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la dirección contraria de la cadena. Si la distancia del sitio de reconocimiento para BceA I en la segunda plantilla está diseñada para

estar a trece (13) bases del sitio de interés (ver FIGS. 4A-4D), la digestión con BceA I generará una proyección 5' de dos bases, que contiene el sitio de interés, y un extremo 3' suspendido que es del sitio de interés. El sitio de interés es el primer nucleótido en la proyección 5' (leyendo de 3' a 5').

También se ve un corte alternativo con la enzima de restricción BceA I, aunque a una frecuencia mucho menor que la observada con BsmF I. La enzima de restricción BceA puede cortar a trece (13) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la dirección de la cadena y a quince (15) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la dirección contraria de la cadena. De esta forma, existen dos poblaciones de moléculas de ADN: moléculas de ADN cortadas a 12/14 y moléculas de ADN cortadas a 13/15. Si el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción está a 13 bases del sitio de interés en el producto amplificado, las moléculas de ADN cortadas en la posición 13/15 producen una proyección 5' que contiene el sitio de interés en la segunda posición de la proyección (leyendo de 3' a 5'). Se pueden usar dideoxinucleótidos marcados para llenar el extremo 3' suspendido de las moléculas de ADN. Las moléculas de ADN cortadas a 13/15 tendrán la base del sitio de interés llenado, y el ADN de las moléculas cortadas a 12/14 serán tendrán lleno el sitio del sitio de interés. Las moléculas de ADN cortadas en 13/15 y las cortadas en 12/14 se pueden separar por tamaño, y se pueden detectar los nucleótidos incorporados. De esta forma, el corte alternativo se puede usar para obtener la información de secuencia adicional.

Alternativamente, si las dos bases en la proyección 5' son diferentes, el extremo 3' suspendido de las moléculas de ADN que fueron cortadas en 13/15 se puede llenar con deoxinucleótido complementario a la primera base en la proyección, y el exceso de deoxinucleótido es lavado. Después del llenado, el extremo 3' suspendido de las moléculas de ADN que fueron cortadas en 12/15 y las moléculas de ADN que fueron cortadas en 13/15 son del sitio de interés. Los extremos 3' suspendidos se pueden llenar ya sea con, dideoxinucleótidos marcados, dideoxinucleótidos no marcados, deoxinucleótidos marcados o deoxinucleótidos no marcados.

Si las plantillas proveen diferentes sitios de restricción para ciertos sitios de interés que fueron copiados, se pueden agregar juntas todas las

enzimas de restricción necesarias para digerir el ADN copiado simultáneamente. Alternativamente, las diferentes digestiones de restricción se pueden hacer en secuencia, por ejemplo, usando una enzima de restricción a la vez, de forma que se digiera solo el producto que es específico para esa enzima de restricción.

Las condiciones óptimas de digestión de la enzima de restricción que incluyen pero no se limitan a concentración de la enzima, temperatura, condiciones del buffer y tiempo de digestión, se pueden optimizar para cada enzima de restricción. Por ejemplo, el corte alternativo observado con la enzima de restricción tipo IIS BsmF I se puede reducir, si se desea, realizando la digestión de la enzima de restricción a temperaturas más bajas que incluyen sin limitarse a 25-16°, 16-12°C, 12-8°C, 8-4°C o 4-0°C.

V. Incorporación de Nucleótidos Marcados

La digestión con la enzima de restricción que reconoce la secuencia en la segunda plantilla genera un extremo 3' suspendido y una proyección 5', que contiene el sitio de interés (FIG. 1G). El extremo 3' se puede llenar usando la proyección 5' como un template en presencia de nucleótidos marcados o no marcados o una combinación de nucleótidos marcados y no marcados. Los nucleótidos se pueden marcar con cualquier tipo de grupo o mitad química que permite la detección, incluyendo pero sin limitarse a moléculas radiactivas, moléculas fluorescentes, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, haptenos, carbohidratos, biotina, derivados de biotina, mitades fosforescentes, mitades luminescentes, mitades electroquimiluminescentes, mitades cromáticas y mitades que tienen una resonancia detectable de giro de electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductividad eléctrica. Los nucleótidos se pueden marcar con uno o más de un tipo de grupo o mitad química. Cada nucleótido se puede marcar con el mismo grupo o mitad química. Alternativamente, cada nucleótido diferente se puede marcar con un grupo o mitad química diferente. Los nucleótidos marcados pueden ser dNTPs, ddNTPs, o una mezcla de ambos dNTPs y ddNTPs. Los nucleótidos no marcados pueden ser dNTPs, ddNTPs, o una mezcla de ambos dNTPs y ddNTPs.

Se puede usar cualquier combinación de nucleótidos para incorporar nucleótidos que incluyen sin limitarse a deoxinucleótidos no marcados, deoxinucleótidos marcados, dideoxinucleótidos no marcados, dideoxinucleótidos marcados, una mezcla de deoxinucleótidos marcados y no marcados, una mezcla de dideoxinucleótidos marcados y no marcados, una mezcla de deoxinucleótidos marcados y dideoxinucleótidos no marcados, una mezcla de deoxinucleótidos marcados y dideoxinucleótidos no marcados, una mezcla de deoxinucleótidos no marcados y dideoxinucleótidos no marcados, una mezcla de deoxinucleótidos no marcados y dideoxinucleótidos marcados, análogos de dideoxinucleótidos, análogos de deoxinucleótidos, una mezcla de análogos de dideoxinucleótidos y análogos de deoxinucleótidos, análogos de nucleósido fosforilado, 2'-deoxinucleótido-5'-trifosfato, y 2'-deoxinucleótido-5'-trifosfato modificado.

Por ejemplo, como se muestra en el FIG. 1H, en presencia de una polimerasa, el extremo 3' suspendido se puede llenar con ddNTP fluorescente usando la proyección 5' como template. El ddNTP incorporado se puede detectar usando cualquier método adecuado que incluye, pero sin limitarse a la detección de fluorescencia.

Todos los cuatro nucleótidos pueden marcarse con diferentes grupos fluorescentes que permitirán que una reacción se realice en presencia de todos los cuatro nucleótidos marcados. Alternativamente, se pueden realizar reacciones de "llenado" separadas para cada sitio de interés; cada una de las cuatro reacciones contendrá un nucleótido marcado diferente (e.g., ddATP*, ddTTP*, ddGTP* o ddCTP*, en donde * indica un nucleótido marcado). Cada nucleótido se puede marcar con grupos químicos diferentes o grupos químicos iguales. Los nucleótidos marcados pueden ser dideoxinucleótidos o deoxinucleótidos.

En otra realización, los nucleótidos se pueden marcar con colorantes fluorescentes que incluyen, pero sin limitarse a fluoresceína, pireno, 7-metoxicumarina, Cascade Blue TM, Alexa Flur 350, Alexa Flur 430, Alexa Flur 488, Alexa Flur 532, Alexa Flur 546, Alexa Flur 568, Alexa Flur 594, Alexa Flur 633, Alexa Flur 647, Alexa Flur 660, Alexa Flur 680, AMCA-X, dialquilaminocumarina, Pacific Blue, Marine Blue, BODIPY FI-X, DTAF,

Oregon Green 500, Dansyl-X, 6-FAM, Oregon Green 488, Oregon Green 514, Rhodamine Green-X, Rhodol Green, calceína, eosina, bromuro de etidio, NBD, TET, 2', 4', 5', 7' tetrabromosulfonafluoresceína, BODIPY-R6G, BODIPY-FI BR2, BODIPY 530/550, HEX, BODIPY 558/568, BODIPY-TMR-X, PyMPO, BODIPY 564/570, TAMRA, BODIPY 576/589, Cy3, Rhodamine Red-x, BODIPY 581/591, carboxiXrodamina, Texas Red-X, BODIPY-TR-X, Cy5, SpectrumAqua, SpectrumGreen #1, SpectrumGreen #2, SpectrumOrange, SpectrumRed o naftofluoresceína.

En otra realización, la reacción de "llenado" se puede realizar con dNTPs marcados fluorescentemente, en donde los nucleótidos están marcados con grupos fluorescentes diferentes. Los nucleótidos incorporados se pueden detectar mediante cualquier método adecuado que incluye, pero sin limitarse a Transferencia de Energía de Resonancia con Fluorescencia (FRET).

En otra realización, se puede usar una mezcla de ddNTPs marcados y dNTPs no marcados para el llenado del extremo 3' suspendido del SNP o sitio de interés. Preferiblemente, la proyección 5' consiste en más de una base incluyendo, pero sin limitarse a 2, 3, 4, 5, 6 o más de 6 bases. Por ejemplo, si la proyección 5' consiste en la secuencia "XGAA", en donde X es el sitio de interés, e.g., SNP, entonces el llenado con una mezcla de ddNTPs marcados y dNTPs no marcados producirá varios fragmentos de ADN diferentes. Si un ddTNP es incorporado en la posición "X", la reacción terminará, y se incorporará una base marcada simple. Sin embargo, si un ddNTP no marcado es incorporado, la polimerasa continua incorporando otras bases hasta que sea un ddTPS marcado sea incorporado. Si los dos primeros nucleótidos incorporados son dNTPs, y el tercero en un ddNTP, el extremo 3' suspendido será extendido en tres bases. Este fragmento de ADN puede ser separado de los otros fragmentos de ADN que fueron extendidos en 1, 2 o 4 bases en tamaño. Una mezcla de ddNTPs marcados y dNTPs no marcados permitirá que todas las bases de la proyección sean llenadas, y provee información adicional de secuencia acerca del sitio de interés, e.g., SNP (ver FIGS. 7E y 9D).

Después de la incorporación del nucleótido marcado, el ADN amplificado puede ser digerido con una enzima de restricción que reconoce

la secuencia proveída por la primera plantilla. Por ejemplo, en la FIG. 11, el ADN amplificado es digerido con una enzima de restricción que se liga a la región "a", que libera el fragmento de ADN que contiene el nucleótido incorporado de la matriz de estreptavidina.

Alternativamente, una plantilla de cada par plantilla de cada sitio de interés, se puede pegar a la matriz de soporte sólido que incluye, pero sin limitarse a una placa microtituladora. Por ejemplo, se pueden usar placas microtituladoras recubiertas con estreptavidina para la reacción de amplificación con un par plantilla, en donde una plantilla está biotinitilada. Primero las plantillas biotinitiladas son enlazadas a las placas microtituladoras de recubiertas de estreptavidina. Luego, las placas se unen con el recipiente de reacción para la amplificación del PCR del sitio de interés. Después que la reacción de amplificación está completa, las plantillas en exceso, sales y template de ADN se pueden remover por lavado. El ADN amplificado permanece pegado a la placa microtituladora. El ADN amplificado puede ser digerido con una enzima de restricción que reconoce una secuencia en la segunda plantilla y genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés. Los fragmentos digeridos pueden ser removidos por lavado. Después de la digestión, el sitio SNP del sitio de interés está expuesto en la proyección 5'. El extremo 3' suspendido es llenado con un nucleótido marcado que incluye, pero sin limitarse a ddNTP fluorescente en presencia de una polimerasa. El ADN marcado se puede liberar en el sobrenadante de la placa microtituladora mediante la digestión con una enzima de restricción que reconoce una secuencia en la región 5' de la primera plantilla.

En otra realización, se puede usar un nucleótido para determinar la secuencia de múltiples alelos de un gen. Se puede usar un nucleótido que termina la reacción de elongación para determinar la secuencia de alelos múltiples de un gen. En un alelo, el nucleótido de terminación es complementario al sitio de interés en la proyección 5' de dicho alelo. El nucleótido es incorporado y termina la reacción. En un alelo diferente, el nucleótido de terminación no es complementario al sitio de interés, que permite que el nucleótido de no-terminación sea incorporado en el sitio de interés del alelo diferente. Sin embargo, el nucleótido de terminación es complementario a un nucleótido aguas abajo del sitio de interés de la

proyección 5' de dicho alelo diferente. La secuencia de los alelos se puede determinar mediante el análisis de los modelos de incorporación del nucleótido de terminación. El nucleótido de terminación puede ser marcado o no marcado.

En otra realización, el nucleótido de terminación es un nucleótido que termina o dificulta la reacción de elongación que incluye, pero sin limitarse a un dideoxynucleótido, un derivado de dideoxynucleótido, un análogo de dideoxynucleótido, un homólogo de dideoxynucleótido, un dideoxynucleótido con un grupo químico azufre, un deoxynucleótido, un derivado de deoxynucleótido, un homólogo de deoxynucleótido,, un análogo de deoxynucleótido, un deoxynucleótido con un grupo químico azufre, arabinosida trifosfato, un análogo de arabinosida trifosfato, un homólogo de arabinosida trifosfato o un derivado de arabinosida trifosfato.

En otra realización, un nucleótido de terminación marcado con un marcador de mitad de generación de señal que incluye, pero no se limita a un colorante fluorescente, se puede usar para determinar la secuencia de los alelos de un sitio de interés. El uso de un nucleótido simple marcado con un marcador de mitad de generación de señal elimina cualquier dificultad que pueda surgir usando mitades fluorescentes diferentes. Además, usando un nucleótido marcado con un marcador de mitad de generación de señal para determinar la secuencia de alelos de un sitio de interés, reduce el número de reacciones, y elimina los errores de pipeteado.

Por ejemplo, si la segunda plantilla contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BsmF I, la digestión generará una proyección 5' de 4 bases. La segunda plantilla se puede diseñar de forma que el sitio de interés esté localizado en la primera posición de la proyección. A continuación se describe una proyección representativa, en donde R representa el sitio de interés:

5' CAC				
3' GTG	R	T	G	G
Posición de la proyección	1	2	3	4

Un nucleótido con un marcador de mitad de generación de señal se puede usar para determinar si el sitio variable es homocigótico o heterocigótico. Por ejemplo, si el sitio variable es adenina (A) o guanina (G), entonces se puede usar, ya sea adenina o guanina para determinar la secuencia de los alelos del sitio de interés, siempre y cuando haya una adenina o guanina en la proyección en la posición 2, 3 o 4.

Por ejemplo, si el nucleótido en la posición 2 de la proyección es timidina, que es complementaria a adenina, entonces se puede usar ddATP marcada, dCTP no marcada, dGTP y dTTP para determinar la secuencia de los alelos del sitio de interés. La ddATP se puede marcar con cualquier mitad de generación de señal que incluye, pero sin limitarse a un colorante fluorescente. Si el template de ADN es homocigótico para adenina, entonces la ddATP* marcada será incorporada en la posición 1 complementaria a la proyección en los alelos, y no se verá incorporación nucleótida en la posición 2, 3 o 4 complementaria a la proyección.

Alelo 1	5' CCC	A*			
	3' GGG	T	T	G	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	A*			
	3' GGG	T	T	G	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

Se verá una señal correspondiente a la incorporación de la ddATP marcada en la posición 1 complementaria a la proyección, que indica que el individuo es homocigótico para adenina en esta posición. Este método de marcado elimina cualquier dificultad que pueda surgir al usar diferentes colorantes que tienen diferentes coeficientes cuánticos.

Guanina homocigótica					
Alelo 1	5' CCC	G	A*		
	3' GGG	C	T	G	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

28

Alelo 2	5' CCC	G	A*		
	3' GGG	C	T	G	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

Se verá una señal correspondiente a la incorporación de la ddATP en la posición 2 complementaria a la proyección, que indica que el individuo es homocigótico para guanina. Las moléculas que son llenadas en la posición 2, complementarias a la proyección, tendrán un peso molecular diferente al de las moléculas llenadas en la posición 1 complementaria a la proyección.

Condición heterocigótica					
Alelo 1	5' CCC	A*			
	3' GGG	T	T	G	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	G	A*		
	3' GGG	C	T	G	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

Se verán dos señales; la primera señal corresponde a la ddATP llenada en la posición uno complementaria a la proyección, y la segunda señal corresponde a la ddATP llenada en la posición 2 complementaria a la proyección. Las dos señales se pueden separar con base en el peso molecular; el alelo 1 y el alelo 2 serán separados por un par base simple, que permite la fácil detección y cuantificación de las señales. Las moléculas llenadas en la posición uno se pueden diferenciar de las moléculas llenadas en la posición dos usando cualquier método discriminatorio con base en el peso molecular que incluye, sin limitarse a electroforesis en gel, electroforesis de gel capilar, secuenciamiento de ADN y espectrometría de masas. No es necesario que el nucleótido esté marcado con una mitad química; las moléculas de ADN correspondientes a los diferentes alelos se pueden separar con base en el peso molecular.

Si la posición 2 de la proyección no es complementaria a adenina, es posible que las posiciones 3 o 4 sean complementarias a adenina. Por ejemplo, la posición 3 de la proyección puede ser complementaria al

nucleótido adenina, en cuyo caso la ddATP marcada se puede usar para determinar la secuencia de ambos alelos.

Homocigótica para adenina					
Alelo 1	5' CCC	A*			
	3' GGG	T	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	A*			
	3' GGG	T	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Homocigótica para guanina					
Alelo 1	5' CCC	G	C	A*	
	3' GGG	C	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	G	C	A*	
	3' GGG	C	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Heterocigótico:					
Alelo 1	5' CCC	A*			
	3' GGG	T	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	G	C	A*	
	3' GGG	C	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

Se verán dos señales; la primera señal corresponde a la ddATP llenada en la posición 1 complementaria a la proyección, y la segunda señal corresponde a la ddATP llenada en la posición 3 complementaria a la proyección. Las dos señales se pueden separar con base en el peso molecular; el alelo 1 y el alelo 2 serán separados por dos bases, que pueden ser detectados usando cualquier método discriminatorio con base en el peso molecular.

Alternativamente, si las posiciones 2 y 3 no son complementarias a adenina (i.e., las posiciones 2 y 3 de la proyección corresponden a guanina, citosina o adenina), pero la posición 4 es complementaria a la adenina, se puede usar la ddATP marcada para determinar la secuencia de ambos alelos.

Homocigótica para adenina					
Alelo 1	5' CCC	A*			
	3' GGG	T	G	G	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	A*			
	3' GGG	T	G	G	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Se verá una señal que corresponde al peso molecular de las moléculas llenadas con ddATP en la posición uno complementaria a la proyección, que indica que el individuo es homocigótico para adenina en el sitio variable.

Homocigótica para guanina					
Alelo 1	5' CCC	G	C	C	A*
	3' GGG	C	G	G	T
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	G	C	C	A*
	3' GGG	C	G	G	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Se verá una señal que corresponde al peso molecular de las moléculas en la posición 4 complementaria a la proyección, que indica que el individuo es homocigótico para guanina.

Heterocigótico:					
Alelo 1	5' CCC	A*			
	3' GGG	T	G	G	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Alelo 2	5' CCC	G	C	C	A*
	3' GGG	C	G	G	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Se verán dos señales; la primera señal corresponde a la ddATP llenada en la posición uno complementaria a la proyección, y la segunda señal corresponde a la ddATP llenada en la posición 4 complementaria a la proyección. Las dos señales se pueden separar con base en el peso molecular, el alelo 1 y el alelo 2 serán separados por tres bases, que permiten la detección y cuantificación de las señales. Las moléculas llenadas en la posición 1 y las llenadas en la posición 4 se pueden diferenciar con base en el peso molecular.

Como se discutió anteriormente, si el sitio variable contiene ya sea adenina o guanina, se puede usar ya sea adenina marcada o guanina marcada, para determinar las secuencias de ambos alelos. Si las posiciones 2, 3 o 4 de la proyección no son complementarias a la adenina pero una de las posiciones es complementaria a la guanina, entonces se puede usar ddGTP marcada para determinar si el template de ADN es homocigótico o heterocigótico para adenina o guanina. Por ejemplo, si la posición 3 en la proyección corresponde a una citosina, entonces se esperarán las siguientes señales, si el template de ADN es homocigótico para guanina, homocigótico para adenina, o heterocigótico:

Homocigótico para guanina

Alelo 1	5' CCC	G*			
	3' GGG	C	T	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Alelo 2	5' CCC	G*			
	3' GGG	C	T	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Se verá una señal que corresponde al peso molecular de las moléculas llenadas con ddGTP en la posición uno complementaria a la proyección, que indica que el individuo es homocigótico para guanina.

Homocigótico para adenina

Alelo 1	5' CCC	A	A	G*	
	3' GGG	T	T	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Alelo 2	5' CCC	A	A	G*	
	3' GGG	T	T	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Se verá una señal que corresponde al peso molecular de las moléculas llenadas en la posición 3 complementaria a la proyección, que indica que el individuo es homocigótico para adenina en el sitio variable.

Heterocigótico:

Alelo 1	5' CCC	G*			
	3' GGG	C	T	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Alelo 2	5' CCC	A	A	G*	
	3' GGG	T	T	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Se verán dos señales; la primera señal corresponde a la ddGTP llenada en la posición uno complementaria a la proyección, y la segunda señal corresponde a la ddGTP llenada en la posición 3 complementaria a la proyección. Las dos señales se pueden separar con base en el peso molecular; el alelo 1 y el alelo 2 serán separados por dos bases, que permiten la detección y cuantificación de las señales.

Algunas enzimas de restricción tipo IIS también muestran corte alternativo como se discutió anteriormente. Por ejemplo, la BsmF I se cortará a 10/14 y a 11/15 del sitio de reconocimiento. Sin embargo, los modelos de corte no son mutuamente exclusivos; si se ve el patrón de corte 11/15 en una secuencia particular, también se ve el corte 10/14. Si la enzima de restricción BsmF I se corta a 10/14 del sitio de reconocimiento, la proyección 5' será $X_1X_2X_3X_4$. Si la enzima de restricción BsmF I se corta a 11/15 del sitio de reconocimiento, la proyección 5' será $X_0X_1X_2X_3$. Si la posición X_0 de la

proyección es complementaria al nucleótido marcado, el nucleótido marcado será incorporado en la posición X_0 y provee un nivel adicional de aseguramiento de calidad. Esto provee información de secuencia adicional.

Por ejemplo, si el sitio variable es adenina o guanina, y la posición 2 de la proyección es complementaria a la adenina, la ddATP marcada se puede usar para determinar el genotipo en el sitio variable. Si la posición 0 de la proyección 11/15 contiene el nucleótido complementario a adenina, la ddATP será llenada y se verá una señal adicional.

Heterocigótico:

Alelo 1 10/14	5' CCA	A*			
	3' GGT	T	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2 10/14	5' CCA	G	C	A*	
	3' GGT	C	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 1 11/15	5' CC	A*			
	3' GG	T	T	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3
Alelo 2 11/15	5' CC	A*			
	3' GG	T	C	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3

Se ven tres señales; una correspondiente a la ddATP incorporada en la posición 0 complementaria a la proyección, una correspondiente al ddATP incorporado en la posición 1 complementaria a la proyección, y una correspondiente a la ddATP incorporada en la posición 3 complementaria a la proyección. Las moléculas llenadas en la posición 0, 1 y 3, complementarias a la proyección son diferentes en peso molecular y se pueden separar usando cualquier técnica discriminatoria con base en el peso molecular que incluye, pero no se limita a espectrometría de masas.

94

Para cuantificar la relación de un alelo a otro alelo o para determinar la cantidad de una secuencia de ADN mutante en presencia de una secuencia de ADN tipo nativa, se debe usar un método de detección preciso y altamente sensible. El corte alternativo mostrado por las enzimas de restricción tipo IIS puede aumentar la dificultad para determinar las relaciones de un alelo a otro alelo, porque la enzima de restricción puede no mostrar el modelo de corte alternativo (11/15) en los dos alelos igualmente. Por ejemplo, el alelo 1 se puede cortar en 10/14 en el 80% del tiempo, y 11/15 en el 20% del tiempo. Sin embargo, como los dos alelos pueden ser diferentes en secuencia, el alelo 2 se puede cortar 10/14 en el 90% del tiempo, y 11/15 en el 20% del tiempo.

Para propósitos de cuantificación, el problema del corte alternativo puede ser eliminado cuando el nucleótido en la posición 0 de la proyección no es complementario al nucleótido marcado. Por ejemplo, si el sitio variable corresponde a adenina o guanina, y la posición 3 de la proyección es complementaria a adenina (*i.e.*, una timidina está en la posición '3 de la proyección), se puede usar una ddATP marcada para determinar el genotipo del sitio variable. Si la posición 0 de la proyección, generado por las propiedades de corte 11/15, no es complementario a adenina, (*i.e.*, la posición 0 de la proyección corresponde a guanina, citosina o adenina), no se verá señal adicional de los fragmentos que fueron cortados a 11/15 del sitio de reconocimiento. La posición 0 complementaria a la proyección se puede llenar con nucleótido no marcado, eliminando cualquier complejidad vista en el modelo de corte alternativo de las enzimas de restricción. Este método provee un método altamente preciso para cuantificar la relación de un sitio variable que incluye, pero no se limita a una mutación o un polimorfismo de nucleótido simple.

Por ejemplo, si el SNP X puede ser adenina o guanina, este método de marcado permite la cuantificación de los alelos que corresponden a adenina y los alelos que corresponden a guanina, sin determinar si la enzima de restricción muestra cualquier diferencia entre los alelos con respecto a los modelos de corte alternos.

Heterocigótico:

Alelo 1 10/14	5' CCG	A*			
	3' GGC	T	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

Alelo 2 10/14	5' CCG	G	C	A*	
	3' GGC	C	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

La proyección generada por las propiedades de corte alternas de BsmF I se describe a continuación:

Alelo 1 11/15	5' CC				
	3' GG	C	T	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3

Alelo 2 11/15	5' CC				
	3' GGT	C	C	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3

Después del llenado con ddATP marcado y dGTP, dCTP, dTTP no marcados, se generaron las siguientes moléculas:

Alelo 1 11/15	5' CC	G	A*		
	3' GG	C	T	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3
Alelo 2 11/15	5' CC	G	G	C	A*
	3' GG	C	C	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3

Se ven dos señales; una correspondiente a las moléculas llenadas con ddATP en la posición uno complementaria a la proyección, y la otra correspondiente a las moléculas llenadas con ddATP en la posición 3 complementaria a la proyección. La posición 0 de la proyección 11/15 está llenada con nucleótido no marcado, que elimina cualquier dificultad de

cuantificar la relación del nucleótido en el sitio variable en el alelo 1 y del nucleótido en el sitio variable del alelo 2.

Se puede usar cualquier nucleótido incluyendo adenina, derivados de adenina, homólogos de adenina, guanina, derivados de guanina, homólogos de guanina, citosina, derivados de citosina, homólogos de citosina, timidina, derivados de timidina u homólogos de timidina, o cualquier combinación de adenina, derivados de adenina, homólogos de adenina, guanina, derivados de guanina, homólogos de guanina, citosina, derivados de citosina, homólogos de citosina, timidina, derivados de timidina u homólogos de timidina.

Los nucleótidos pueden estar marcados con cualquier grupo o mitad química que incluye, pero sin limitarse a moléculas radiactivas, moléculas fluorescentes, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, haptenos, carbohidratos, biotina, derivados de biotina, mitades fosforescentes, mitades luminescentes, mitades electroquimiluminescentes, mitades cromáticas y mitades que tienen una resonancia detectable de giro de electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductividad eléctrica. El nucleótido puede ser marcado con uno o más de un tipo de grupo o mitad química.

En otra realización, se pueden usar nucleótidos marcados y no marcados. Se puede usar cualquier combinación de deoxinucleótidos y dideoxinucleótidos que incluyen, pero sin limitarse a dideoxinucleótidos marcados y deoxinucleótidos marcados, dideoxinucleótidos marcados y deoxinucleótidos no marcados, dideoxinucleótidos no marcados y deoxinucleótidos no marcados, y dideoxinucleótidos no marcados y deoxinucleótidos marcados.

En otra realización, se pueden usar nucleótidos marcados con una mitad química en la reacción de PCR. Luego se usan nucleótidos no marcados para llenar las proyecciones 5' generadas después de la digestión con la enzima de restricción. Se puede usar un nucleótido de terminación no marcado en presencia de nucleótidos no marcados para determinar la secuencia de los alelos de un sitio de interés.

Por ejemplo, si se usara dTTP marcado en la reacción de PCR, se generaría la siguiente proyección 5' después de la digestión con BsmF I:

Alelo 1 10/14	5' CT*G	A				
	3' GAC	T	G	T	G	
Posición de la proyección		1	2	3	4	
Alelo 2 10/14	5' CT*G	G	C	A		
	3' GAC	C	G	T	G	
Posición de la proyección		1	2	3	4	

Se puede usar ddATP no marcada, dCTP no marcada, dGTP no marcada, y dTTP no marcada para llenar la proyección 5'. Se generarán dos señales: una señal corresponde a las moléculas de ADN llenadas con ddATP no marcado en la posición 1 complementaria a la proyección, y la segunda señal corresponde a las moléculas de ADN llenadas con ddATP no marcado en la posición 3 complementaria a la proyección. Las moléculas de ADN se pueden separar con base en el peso molecular y se pueden detectar mediante fluorescencia del dTTP que fue incorporado durante la reacción de PCR.

El ADN marcado de los sitios de sitios de interés se puede analizar mediante una variedad de métodos que incluyen, pero sin limitarse a detección de fluorescencia, secuenciamiento de ADN, electroforesis capilar en una máquina de secuenciamiento de ADN automatizada, electroforesis de microcanal y otros métodos de secuenciamiento, espectrometría de masas, espectrometría de masas de tiempo de vuelo, espectrometría de masas cuadrupolar, espectrometría de masas de sector magnético, espectrometría de masas de sector eléctrico, espectrometría de infrarrojo, espectrometría de ultravioleta, amperimetría palentioestática o mediante técnicas de hidridación de ADN que incluyen manchas al sur, manchas en canal y manchas punteadas, y microformaciones de ADN, en donde los fragmentos de ADN serían útiles tanto como "pruebas" como "objetivos", ELISA, fluorometría y transferencia de energía de resonancia con fluorescencia (FRET).

Este método de marcado es extremadamente sensible y permite la detección de alelos de un sitio de interés que está en diferentes relaciones que incluyen, sin limitarse a 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6-1:10, 1:11-1:20, 1:21-1:30, 1:31-1:40, 1:41-1:50, 1:51-1:60, 1:61-1:70, 1:71-1:80, 1:81-1:90, 1:91-1:100, 1:101-1:200, 1:250, 1:251-1:300, 1:301-1:400, 1:401-1:500, 1:501-1:600, 1:601-1:700, 1:701-1:800, 1:801-1:900, 1:901-1:1000, 1:1001-1:2000, 1:2001-1:3000, 1:3001-1:4000, 1:4001-1:5000, 1:5001-1:6000, 1:6001-1:7000, 1:7001-1:8000, 1:8001-1:9000, 1:9001-1:10,000; 1:10,001-1:20,000, 1:20,001-1:30,000, 1:30,001-1:40,000, 1:40,001-1:50,000 y más de 1:50,000.

Por ejemplo, este método permite usar un nucleótido marcado con una mitad que genera señal, para determinar la secuencia de un alelo que codifica resistencia antibiótica de una célula bacteriana, entre alelos de bacterias sensibles a los antibióticos, o detectar un alelo de virus resistente a un fármaco entre alelos de virus sensibles al fármaco, o detectar un alelo de una cepa bacteriana no patógena entre alelos de una cepa bacteriana patógena.

Como se mostró anteriormente, se puede usar un nucleótido simple para determinar la secuencia de los alelos en un sitio de interés particular. Este método es útil especialmente para determinar si un individuo es homocigótico o heterocigótico para una mutación particular o para determinar la secuencia de los alelos en un sitio SNP particular. Este método de marcado elimina cualquier error causado por los coeficientes cuánticos de varios colorantes. También permite que la reacción proceda en un recipiente de reacción simple que incluye, pero no se limita a una placa microtituladora, o un tubo eppendorf simple.

Este método de marcado es especialmente útil para la detección de señales genéticas múltiples en la misma muestra. Por ejemplo, este método es útil para la detección de ADN fetal en la sangre, suero o plasma de la hembra embarazada, que contiene ADN materno y ADN fetal. El ADN materno y el ADN fetal pueden estar presentes en la sangre, suero o plasma en relaciones como 97:3; sin embargo, el método descrito anteriormente se puede usar para detectar el ADN fetal. Este método de marcado se puede usar para detectar dos, tres o cuatro señales genéticas diferentes en la población de muestra.

Este método de marcado es útil especialmente para la detección de un alelo mutante que está entre una población grande de alelos tipo nativo. Además, este método de marcado permite la detección de una célula mutante simple en una población grande de células tipo nativas. Por ejemplo, este método de marcado se puede usar para detectar una célula cancerosa simple entre una población grande de células normales. Típicamente, las células cancerosas tienen mutaciones en la secuencia de ADN. La secuencia de ADN mutante se puede identificar incluso si hay un antecedente grande de secuencia de ADN tipo nativa. Este método de marcado se puede usar para seleccionar, detectar o diagnosticar cualquier tipo de cáncer incluyendo, pero sin limitarse a cáncer de colon, renal, seno, vejiga, hígado, riñón, cerebro, pulmón, próstata y cánceres de la sangre incluyendo leucemia.

Este método de marcado también se puede usar para detectar organismos patógenos que incluyen, pero no se limitan a bacterias, hongos, virus, protozoos y microbacterias. También se puede usar para discriminar entre cepas patógenas de microorganismos y cepas no patógenas de microorganismos incluyendo, pero sin limitarse a bacterias, hongos, virus, protozoos y microbacterias.

Por ejemplo, hay varias cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*), y la mayoría no son patógenas. Sin embargo, varias cepas, como la *E. coli* O157 son patógenas. Existen diferencias genéticas entre las cepas *E. coli* no patógenas y *E. coli* patógenas. El método de marcado descrito anteriormente se puede usar para detectar microorganismos patógenos en una población grande de organismos no patógenos, que algunas veces están asociados con la flora normal de un individuo.

VI. Análisis del sitio de interés

Los sitios de interés pueden ser analizados mediante una variedad de métodos que incluyen, pero no se limitan a detección de fluorescencia, gel de secuenciamiento de ADN, electroforesis capilar en una máquina de secuenciamiento de ADN automatizada (e.g., el Analizador Genético ABI Prism 3100 o el Analizador Genético ABI Prism 3700), electroforesis de

microcanal y otros métodos de secuenciamiento, secuenciamiento dideoxi de Sanger, espectrometría de masas, espectrometría de masas de tiempo de vuelo, espectrometría de masas cuadrupolar, espectrometría de masas de sector magnético, espectrometría de masas de sector eléctrico, espectrometría de infrarrojo, espectrometría de ultravioleta, amperimetría potencioestática o mediante técnicas de hibridación de ADN que incluyen manchas al sur, manchas en canal y manchas punteadas, y microformación de ADN, en donde los fragmentos de ADN serían útiles tanto como "pruebas" como "objetivos", ELISA, fluorimetría, polarización de fluorescencia y transferencia de energía de resonancia con fluorescencia (FRET).

Los sitios de interés pueden ser analizados usando electroforesis en gel seguida de detección de fluorescencia del nucleótido incorporado. Otro método para analizar o leer los sitios de interés es el uso de un lector de placa fluorescente o fluorímetro directamente sobre las placas de 96 agujeros recubiertas de estreptavidina. La placa puede estar colocada en un lector de placa fluorescente o escáner como el Pharmacia 9200 Typhoon, para leer cada sitio de interés.

Alternativamente, los productos de PCR de los sitios de interés pueden ser recolectados, y después del "llenado" (FIG.10), los productos pueden ser separados por tamaño, usando cualquier método adecuado para esto, y luego ser analizados usando una variedad de técnicas que incluyen, pero sin limitarse a detección de fluorescencia, gel de secuenciamiento de ADN, electroforesis capilar en una máquina de secuenciamiento de ADN automatizada, electroforesis de microcanal y otros métodos de secuenciamiento, secuenciamiento dideoxi de Sanger, técnicas de hibridación de ADN que incluyen manchas al sur, manchas en canal y manchas punteadas, y microformación de ADN, espectrometría de masas, espectrometría de masas de tiempo de vuelo, espectrometría de masas cuadrupolar, espectrometría de masas de sector magnético, espectrometría de masas de sector eléctrico, espectrometría de infrarrojo, espectrometría de ultravioleta, amperimetría potencioestática. Por ejemplo, se puede usar la electroforesis en gel de poliacrilamida para separar el ADN por tamaño, y el gel puede ser rastreado para determinar el color de fluorescencia en cada

banda (usando e.g., la máquina de secuenciamiento de ADN ABI 377 o un Pharmacia Typhoon 9200).

En otra realización, la secuencia del sitio de interés se puede determinar mediante la detección de la incorporación de un nucleótido que está 3' del sitio de interés, en donde dicho nucleótido es un nucleótido diferente de los nucleótidos posibles en el sitio de interés. Esta realización es útil especialmente para el secuenciamiento y detección de SNPs. La eficiencia y velocidad a la cual las polimerasas de ADN incorporan nucleótidos varía para cada nucleótido.

Según los datos de Proyecto del Genoma Humano, el 99% de todos los SNPs son binarios. La secuencia del genoma humano se puede usar para determinar un nucleótido que está a 3' del SNP de interés. Cuando un nucleótido que está a 3' del sitio SNP es diferente a los nucleótidos posibles en el sitio SNP, se puede usar un nucleótido que está a una o más de una base de 3' al SNP para determinar la secuencia del sitio SNP.

Por ejemplo, suponga que se va a determinar la secuencia SNP X en el cromosoma 13. La secuencia del genoma humano indica que SNP X puede ser adenosina o guanina y que un nucleótido a 3' del sitio de interés es una timidina. Una plantilla que contiene un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para BsmF I, que está diseñado para estar a 13 bases del sitio de interés después de la amplificación, se usa para amplificar el fragmento de ADN que contiene el SNP X. La digestión con la enzima de restricción BsmF I genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés, que puede ser adenosina o guanina. Los productos de digestión se pueden dividir en dos reacciones de "llenado": una contiene dTTP, y la otra reacción contiene dCTP. Si el sitio de interés es homocigótico para guanina, solo las moléculas de ADN que fueron mezcladas con dCTP serán llenadas. Si el sitio de interés es homocigótico para adenosina, solo las moléculas que fueron mezcladas con dTTP serán llenadas. Si el sitio de interés es heterocigótico, las moléculas de ADN que fueron mezcladas con dCTP serán llenadas así como las moléculas de ADN que fueron llenadas con dTTP. Después del lavado para remover el exceso de dNTP, las muestras son llenadas con ddATP marcado, que es complementario al nucleótido (timidina) que está a 3' del sitio de interés. Las moléculas de ADN que

fueron llenadas en la reacción anterior serán llenadas con ddATP. Si el individuo es homocigótico para adenosina, las moléculas de ADN que fueron mezcladas con dTTP serán llenadas posteriormente con ddATP marcado. Sin embargo, las moléculas de ADN que fueron mezcladas con dCTP, no tendrían incorporado el nucleótido, y por lo tanto, no podrían incorporar ddATP. La detección de ddATP marcado solo en las moléculas que fueron mezcladas con dTTP indica que el nucleótido en SNP X en el cromosoma 13 es adenosina.

En otra realización, se puede realizar la detección a gran escala de la presencia o ausencia de polimorfismos de nucleótido simples o mutaciones. Se pueden amplificar de uno a decenas, a cientos, a miles de sitios de interés en un cromosoma simple o en múltiples cromosomas, con plantillas como se describió en la sección anterior "Diseño de la Plantilla". Las plantillas pueden ser diseñadas de forma que cada sitio de interés amplificado sea de diferente tamaño (FIG.). Los múltiples sitios de interés pueden ser de una muestra de ADN de un individuo que representa múltiples sitios de interés en un cromosoma simple, cromosomas múltiples, genes múltiples, un gen simple o cualquier combinación de estos.

Cuando se analizan los datos humanos, la secuencia conocida puede ser una secuencia específica que ha sido determinada de un individuo (incluyendo e.g., el individuo cuyo ADN está siendo analizado actualmente), o puede ser de una secuencia de consenso como la publicada como parte del genoma humano.

Relación de alelos en los sitios de interés heterocigóticos

En una realización, se puede calcular la relación de alelos en un sitio de interés heterocigótico. La intensidad de un nucleótido en los sitios de interés se puede cuantificar usando cualquier cantidad de programas de computadora que incluyen, pero no se limitan a GeneScan e ImageQuant. Por ejemplo, para un SNP heterocigótico, hay dos nucleótidos, y cada uno puede estar presente en una relación 1:1. En una realización preferida, se puede calcular la relación de SNPs heterocigóticos múltiples.

En una realización, se puede calcular la relación de un nucleótido variable en alelos en un sitio de interés heterocigótico. La intensidad de cada nucleótido variable presente en los sitios de interés se puede cuantificar usando cualquier cantidad de programas de computadora que incluyen, pero no se limitan a GeneScan e ImageQuant. Por ejemplo, para un SNP heterocigótico, habrán dos nucleótidos presentes, y cada uno puede estar presente en una relación 1:1. En una realización preferida, se puede calcular la relación de SNPs heterocigóticos múltiples.

En otra realización, la relación de alelos en un sitio de interés heterocigótico de un cromosoma se suma y compara a la relación de alelos en un sitio de interés heterocigótico de un cromosoma diferente. En una realización preferida, la relación de alelos en múltiples sitios de interés heterocigóticos de un cromosoma se suma y compara a la relación de alelos en múltiples sitios de interés heterocigóticos de un cromosoma diferente. La relación de alelos de SNP 1, SNP 2, SNP 3, SNP 4, etc., en el cromosoma 1 se puede sumar. Luego, esta relación puede ser comparada a la relación obtenida de SNP A, SNP B, SNP C, SNP D, etc.

Por ejemplo, se pueden analizar 100 SNPs en el cromosoma 1. De estos 100 SNPs, se asume que 50 son heterocigóticos. La relación de los alelos en los SNPs heterocigóticos en el cromosoma 1 se puede sumar, y debe dar una relación de aproximadamente 50:50. Asimismo, de 100 SNPs analizados en el cromosoma 21, se asume que 50 son heterocigóticos. La relación de alelos en los SNPs heterocigóticos en el cromosoma 21 se suma. Con un número normal de cromosomas, la relación debe ser aproximadamente 50:50, y de este modo, no debe haber diferencia entre la relación obtenida entre el cromosoma 1 y 21.

Sin embargo, si hay una copia adicional de cromosoma 21, se proveerá un alelo adicional, y la relación será de aproximadamente 66:33. Así, la relación de nucleótidos en SNPs heterocigóticos se puede usar para detectar la presencia o ausencia de anomalías cromosómicas. Se puede detectar cualquier anomalía cromosómica incluyendo aneuploidía, poliploidía, inversión, una trisomía, una monosomía, duplicación, eliminación, eliminación de una parte del cromosoma, adición, adición de una parte del cromosoma, inserción, un fragmento de un cromosoma, una región de un cromosoma, redistribución cromosómica y translocación. Este método es útil

especialmente para la detección de trisomía 13, trisomía 18, trisomía 21, XXY y XYY.

La presente invención provee un método para cuantificar una relación de los alelos en un sitio de interés heterocigótico. Los sitios de interés incluyen, pero sin limitarse a polimorfismos de nucleótido simple, mutaciones. No es necesario amplificar la secuencia entera de un gen o cuantificar la cantidad de un producto gen particular. La presente invención no se basa en PCR cuantitativa.

Detección de Anormalidades cromosómicas fetales

Como se discutió en la sección anterior titulada "Template de ADN", el template de ADN se puede obtener de una muestra de una hembra embarazada, en donde el template de ADN comprende template de ADN materno y template de ADN fetal. En una realización, el template de ADN es obtenido de la sangre de una hembra embarazada. En una realización preferida, el template de ADN es obtenido del plasma o suero de la sangre de una hembra embarazada.

En una realización, el template de ADN de una muestra de una hembra embarazada comprende template de ADN materno y template de ADN fetal. En otra realización, el template de ADN materno es obtenido de cualquier fuente que contiene ácido nucleico incluyendo, pero sin limitarse a células, tejido, sangre, suero, plasma, saliva, orina, lágrimas, secreción vaginal, fluido linfático, fluido cerebroespinal, secreción mucosa, fluido peritoneal, fluido ascítico, materia fecal o transpiraciones corporales, y es secuenciado para identificar sitios de interés homocigóticos o heterocigóticos, que son los sitios de interés analizados en el template de ADN obtenido de la muestra de la hembra embarazada.

En una realización preferida, la secuencia de los alelos de múltiples sitios de interés en el template de ADN materno es determinada para identificar los sitios de interés homocigóticos. En otra realización, la secuencia de los alelos de múltiples sitios de interés en el template de ADN materno es determinada para identificar los sitios de interés heterocigóticos. La secuencia de alelos de múltiples sitios de interés en el template de ADN

405

materno se puede determinar en una reacción simple o en reacciones múltiples.

Por ejemplo, si se analizan 100 sitios de interés maternos en el cromosoma 21 y 100 sitios de interés maternos en el cromosoma 1, se predeciría que aproximadamente 50 sitios de interés en cada cromosoma son homocigóticos y 50 son heterocigóticos. Se pueden analizar los 50 sitios de interés homocigóticos, o los 50 sitios de interés heterocigóticos, o los 50 sitios de interés homocigóticos y los 50 sitios de interés heterocigóticos, o cualquier combinación de los sitios de interés homocigóticos y heterocigóticos de cada cromosoma, usando el template de ADN de la muestra de la hembra embarazada.

El sitio de interés del template de ADN de la muestra de la hembra embarazada es analizado usando los métodos de amplificación, aislamiento, digestión, llenado y detección descritos anteriormente. Las mismas plantillas usadas para analizar el sitio de interés en el template de ADN materno se usan para detectar el template de ADN de una muestra de una hembra embarazada. Se puede analizar cualquier cantidad de sitios de interés del template de ADN de la muestra de la hembra embarazada. Por ejemplo, se pueden analizar 1, 1-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-500, 500-1000, 1000-2000, 2000-3000, 3000-4000 o más de 4000 sitios de interés homocigóticos maternos, en el template de ADN de la muestra de la hembra embarazada.

En la población de sitios de interés homocigóticos maternos, habrán sitios de interés homocigóticos y heterocigóticos maternos del template de ADN de la muestra de la hembra embarazada. Los sitios de interés heterocigóticos se pueden analizar adicionalmente. En los sitios de interés heterocigóticos, se puede usar la relación de alelos para determinar el número de cromosomas que están presentes.

El porcentaje de ADN fetal presente en la muestra de la hembra embarazada se puede calcular mediante la determinación de la relación de alelos en los sitios de interés heterocigóticos en un cromosoma que no está típicamente asociado con una anomalía cromosómica. En una

realización preferida, la relación de alelos en múltiples sitios de interés heterocigóticos en un cromosoma se puede usar para determinar el porcentaje de ADN fetal. Por ejemplo, se puede usar el cromosoma 1, que es el cromosoma más grande en el genoma humano, para determinar el porcentaje de ADN fetal.

Por ejemplo, suponga que el SNP X es homocigótico en el template de ADN materno (A/A). En SNP X, el template de ADN de la muestra de la hembra embarazada, que puede contener ADN fetal y ADN materno, es heterocigótico (A/G). El nucleótido guanina represente el ADN fetal porque en SNP X la madre es homocigótica, y de esta forma la guanina es atribuida al ADN fetal. La guanina en SNP X se puede usar para calcular el porcentaje de ADN fetal en la muestra.

Alternativamente, se pueden examinar múltiples sitios de interés en dos o más cromosomas para determinar el porcentaje de ADN fetal. Por ejemplo, se pueden examinar múltiples sitios de interés en los cromosomas 13 y 18 para determinar el porcentaje de ADN fetal porque los organismos con anomalías cromosómicas en el cromosoma 13 y 18 no son viables.

Alternativamente, para un feto macho, se puede usar un marcador en el cromosoma Y para determinar la cantidad de ADN fetal presente en la muestra. Se puede hacer un panel de diluciones seriales usando un template de ADN aislado de la muestra de la hembra embarazada, y realizar el análisis de PCR. Se pueden realizar dos reacciones de PCR: una reacción de PCR para amplificar el marcador en el cromosoma Y, por ejemplo SRY, y la otra reacción para amplificar una región en cualquiera de los cromosomas autosómicos. La cantidad de ADN fetal se puede calcular usando la siguiente fórmula:

Porcentaje de ADN fetal: (cromosoma Y detectado en la última dilución / cromosoma autosómico detectado en la última dilución) * 2 * 100.

La relación esperada del alelo paterno a alelo materno depende de la cantidad de ADN presente en la muestra de la hembra embarazada. Por ejemplo, si en un SNP A, la madre es homocigótica A/A, y el feto es heterocigótico A/G, entonces la relación A:G se puede usar para detectar las

anormalidades cromosómicas. Si el ADN fetal es el cincuenta por ciento (50%) del ADN en la sangre materna, entonces el SNP A, en donde el nucleótido materno es una adenina y el otro nucleótido, que es aportado por el padre, es una guanina, se esperaría que la relación de adenina (dos adeninas del template de ADN materno y una del template de ADN fetal) a guanina (del template de ADN fetal) sea 75:25. Sin embargo, si el feto tiene una trisomía de este cromosoma particular, y el cromosoma adicional es aportado por la madre, y de esta forma el nucleótido de adenina está presente, entonces se esperaría una relación de 83.4:16.6 (el ADN fetal es el 50% del ADN en la sangre materna, de forma que cada nucleótido aportado por el feto, las dos adeninas y la guanina son cada uno 16.66% del ADN total en la muestra). De esta forma se detectaría un 8% de aumento en la señal de adenina y un 8% en la señal de guanina. Por otra parte, si el cromosoma adicional es aportado por el padre, y así está la guanina presente, se esperaría una relación de 66.6:33.4.

Sin embargo, si el ADN fetal es el 40% del ADN en la sangre materna, la relación esperada sin una trisomía es 80:20. Si el feto tiene una trisomía, y el cromosoma adicional es aportado por la madre, la relación esperada sería 86.6:13.3. Se detectaría un aumento del 6.6% en la señal de adenina y un descenso del 6.6% en la señal de guanina.

En otra realización, se pueden examinar múltiples sitios de interés de múltiples cromosomas. Las relaciones de los alelos en cada sitio de interés heterocigótico en un cromosoma se pueden sumar y comparar con las relaciones para los alelos en cada sitio de interés en un cromosoma diferente. Los cromosomas comparados pueden ser de origen humano, e incluyen, pero no se limitan a los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, X y Y. La relación obtenida de los múltiples cromosomas se puede comparar con la relación obtenida de un cromosoma o de múltiples cromosomas.

En una realización, uno de los cromosomas usado en la comparación puede ser el cromosoma 13, 16, 18, 21, 22, X y Y. En una realización preferida, las relaciones de los cromosomas 13, 18 y 21 son comparadas.

Por ejemplo, asumiendo un 40% de ADN fetal en la muestra de la hembra embarazada, la relación de los alelos en un sitio de interés heterocigótico en el cromosoma 1 será 80:20. Asimismo, la relación de alelos en un sitio de interés heterocigótico en el cromosoma 21 estará presente en una relación 80:20.

Sin embargo, en un feto con trisomía 21, en donde el cromosoma adicional es aportado por la madre, los nucleótidos en el sitio de interés heterocigótico en el cromosoma 21, estarán presentes en una relación 86.6:13.3. En contraste, la relación del cromosoma 1 permanecerá en 80:20, y así el aumento del 6.6% en el nucleótido materno en el cromosoma 21 significará un cromosoma adicional o parte de un cromosoma. Se pueden analizar de uno a decenas, a cientos a miles de puntos de interés.

En otra realización, los sitios de interés del template de ADN de la muestra de la hembra embarazada se puede genotipar; se identificarán sitios de interés homocigóticos y heterocigóticos.

La relación de los alelos en los sitios de interés se puede usar para determinar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica. El template de ADN de una muestra de una hembra embarazada contiene tanto template de ADN materno como template de ADN fetal. Hay tres posibilidades en cada SNP para el template de ADN materno como para el template de ADN fetal: heterocigótico, homocigótico para alelo 1 o homocigótico para alelo 2. Las relaciones posibles de nucleótidos para un SNP que es una adenina o una guanina se muestran en la tabla II. Las relaciones presentadas en la Tabla II están calculadas con ADN fetal al 50% del ADN en la muestra de la hembra embarazada.

Tabla II. Relaciones para nucleótidos en un SNP heterocigótico

SNP Materno	SNP Fetal		
	A/A	G/G	A/G
A/A	100% A	N/A	75% A, 25% G
G/G	N/A	100% G	25% A, 75% G
A/G	75% A, 25% G	25% A, 75% G	50% A, 50%G

Hay tres relaciones de nucleótidos: 100% de un nucleótido simple, 50:50, 75:25. Estas relaciones variarán dependiendo de la cantidad de ADN fetal presente en la muestra de una hembra embarazada. Sin embargo, el porcentaje de ADN fetal debe ser constante sin importar el cromosoma analizado. Por lo tanto, si los cromosomas están presentes en dos copias, se verán las relaciones calculadas anteriormente.

Por otra parte, estos porcentajes variarán cuando está presente un cromosoma adicional. Por ejemplo, asuma que SNP X puede ser adenina o guanina, y el porcentaje de ADN fetal en la muestra de hembra embarazada es 50%. El análisis de los sitios de interés en el cromosoma 1 proveerá las relaciones discutidas anteriormente: 100:0, 50:50 y 75:25. Las relaciones posibles para un SNP que es A/G con un cromosoma adicional se dan en la Tabla III.

Tabla III. Relaciones de nucleótidos en un SNP cuando está presente una copia adicional de un cromosoma

SNP Fetal				
SNP X Materno	A/A/A	G/G/G	A/G/G	A/G
A/A	100% A	N/A	60% A, 40% G	80% A, 20% G
G/G	N/A	100% G	20% A, 80% G	40% A, 60% G
A/G	80% A, 20% G	20% A, 80% G	40% A, 60%G	60% A, 40%G

Las posibles relaciones para los alelos en los SNP heterocigóticos con una copia adicional de un cromosoma son: 100:0, 60:40 y 80:20. Dos de esas relaciones, 60:40 y 80:20 son diferentes de las relaciones de alelos en los SNPs heterocigóticos obtenidos con dos copias de un cromosoma. Como se discutió anteriormente, las relaciones de los nucleótidos en los SNP heterocigóticos dependen de la cantidad de ADN fetal presente en la muestra. Sin embargo, sin importar como son, permanecen constantes en los cromsomas a menos que haya una anomalía cromosómica.

La relación de alelos en los sitios de interés heterocigóticos en un cromosoma se puede comparar con la relación de alelos en sitios de interés

MD

heterocigóticos en un cromosoma diferente. Por ejemplo, la relación de múltiples sitios de interés en el cromosoma 1 (la relación en SNP 1, SNP 2, SNP 3, SNP 4, etc.) se puede comparar con la relación de múltiples sitios de interés en el cromosoma 21 (la relación en SNP A, SNP B, SNP C, SNP D, etc.). Cualquier cromosoma se puede comparar a cualquier otro cromosoma. No hay límite en el número de cromosomas que pueden ser comparados.

Con referencia a los datos de las Tablas II y III anteriores, las relaciones de los nucleótidos en un SNP heterocigótico en el cromosoma 1, que estaba presente en dos copias, fue 75:25 y 50:50. En el otro, la relación de los nucleótidos en un SNP heterocigótico en el cromosoma 21, que estaba presente en tres copias, fue de 60:40 y 80:20. La diferencia entre estas dos relaciones indica una anomalía cromosómica. Las relaciones pueden ser pre-calculadas para el rango total de grados de variación del ADN fetal presente en el suero materno. Las Tablas II y III demuestran que se pueden usar sitios de interés homocigóticos y heterocigóticos para detectar la presencia de una anomalía cromosómica fetal.

Los ejemplos anteriores ilustran cómo se pueden usar las relaciones de nucleótidos en los SNPs heterocigóticos para detectar la presencia de un cromosoma adicional. Se puede usar el mismo tipo de análisis para detectar redistribuciones cromosómicas, translocaciones, mini-cromosomas, duplicaciones de regiones de cromosomas, monosomías, eliminaciones de regiones de cromosomas y fragmentos de cromosomas. La presente invención no cuantifica la cantidad de producto gen fetal, ni la utilidad de la presente invención se limita al análisis de los genes encontrados en el cromosoma Y. La presente invención no se basa simplemente en la detección de un ácido nucleico paterno heredado, sino que, la presente invención provee un método que permite calcular la relación materna:paterna de alelos heredados en los sitios de interés, incluyendo los SNPs. El método no requiere genotipar la madre o el padre.

Cualquier cromosoma de cualquier organismo se puede analizar usando los métodos de la invención. Por ejemplo, en los humanos, se pueden analizar los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X o Y usando los métodos de la invención.

La relación de alelos en un sitio de interés heterocigótico en cualquier cromosoma se puede comparar con la relación de alelos en un sitio de interés heterocigótico en cualquier otro cromosoma.

De esta forma, la presente invención provee una técnica no invasiva, que es independiente del aislamiento celular fetal, para una detección rápida, precisa y definitiva de anomalías cromosómicas en un feto. La presente invención también provee un método no invasivo para determinar la secuencia de ADN de un feto. La presente invención se puede usar para detectar cualquier alteración en la secuencia del gen comparada con la secuencia tipo nativa incluyendo, pero sin limitarse a mutación puntual, cambio en el marco de lectura, transición, transversión, adición, inserción, eliminación, adición-eliminación, cambio de marco, sin sentido, mutación reversa y alteración microsatelital.

Detección de Anomalías Cromosómicas usando Repeticiones Tándem Cortas

Repeticiones tándem cortas (STRs) son secuencias cortas de ADN, normalmente de 2-5 pares base de longitud, que se repiten varias veces en forma de cabeza-cola. Las secuencias de ADN repetidas en tándem, están extendidas en todo el genoma humano, y muestran suficiente variabilidad entre los individuos de una población. Los minisatélites tienen repeticiones de núcleo 9-80 pares de bases.

En otra realización, las repeticiones tándem cortas se pueden usar para detectar anomalías cromosómicas. El template de ADN se puede obtener de un ácido nucleico que contiene una muestra, que incluye sin limitarse a células, tejidos, sangre, suero, plasma, saliva, orina, lágrimas, secreción vaginal, fluido linfático, fluido cerebroespinal, secreción mucosa, fluido peritoneal, fluido ascítico, materia fecal o transpiración corporal.

En otra realización, un inhibidor de lisis de célula se agrega al ácido nucleico que contiene la muestra. En una realización preferida, el template de ADN es obtenido de la sangre de una hembra embarazada. En otra realización, el template de ADN es obtenido del plasma o suero de la sangre de una hembra embarazada.

El template de ADN obtenido de la sangre de una hembra embarazada contendrá ADN fetal y ADN materno. El ADN fetal contiene STRs de la madre y del padre. La variación de los STRs entre la madre y el padre se puede usar para detectar anomalías cromosómicas.

Se pueden diseñar plantillas amplificar las repeticiones tándem cortas. Se puede usar cualquier método de amplificación que incluye, pero sin limitarse a reacción en cadena de polimerasa, amplificación rápida de extremos de cADN, reacción en cadena de polimerasa y reacción en cadena de ligasa, amplificación de fago Q-beta, amplificación de desplazamiento de cadena y reacción en cadena de polimerasa de empalme de superposición. En una realización preferida, se usa la PCR.

Se puede analizar cualquier número de repeticiones tándem cortas incluyendo, pero sin limitarse a 1-5, 5-10, 10-50, 50-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-1000, y más de 1000. Las repeticiones tándem cortas se pueden analizar en una reacción PCR simple o en múltiples reacciones PCR. En una realización preferida, se analizan las STRs de cromosomas múltiples.

Después de la amplificación, los productos de PCR se pueden analizar mediante cualquier cantidad de métodos que incluyen, pero sin restringirse a electroforesis en gel y espectrometría de masas. El template de ADN de la hembra embarazada contiene STRs de origen materno y paterno. Las STRs de origen paterno representan el ADN fetal. Las STRs maternas y paternas pueden ser idénticas en longitud, o las Las STRs maternas y paternas pueden ser diferentes.

STRs heterocigóticas son aquellas en donde el materno y el paterno difieren en longitud. Se puede cuantificar la cantidad de cada producto de PCR para cada STR heterocigótico. Con un número normal de cromosomas, la cantidad de cada producto de PCR debe ser aproximadamente igual. Sin embargo, con un cromosoma extra, uno de los productos PCR de STR estará presente en una cantidad mayor.

Por ejemplo, se pueden analizar múltiples STRs en el cromosoma 1 del template de ADN obtenido de la sangre de la hembra embarazada.

Cada STR, ya sea de origen materno o paterno, debe estar presente en aproximadamente la misma cantidad. Asimismo, con dos cromosomas 21, cada STR debe estar presente en aproximadamente la misma cantidad. Sin embargo, con una trisomía 21, uno de los productos de PCR de STR, cuando el materno y el paterno difieren en longitud (un STR heterocigótico) debe estar presente en una cantidad más alta. La relación de cada STR heterocigótico en un cromosoma se puede comparar con la relación de cada STR heterocigótico en un cromosoma diferente, en donde una diferencia indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica.

Kits

Los métodos de la invención son practicados más convenientemente al suministrar los reactivos usados en los métodos, en forma de kits. Un kit preferiblemente contiene uno o más de los siguientes componentes: instrucciones escritas para el uso del kit, buffers apropiados, sales, detergentes de extracción de ADN, plantillas, nucleótidos, nucleótidos marcados, materiales de modificación del extremo 5', y si se desea, agua de la pureza apropiada, confinados en contenedores o paquetes separados. Tales componentes permiten que el usuario del kit extraiga la muestra apropiada de ácido nucleico, y la analice según los métodos de la invención. Las plantillas que se proveen con el kit variarán dependiendo del propósito del kit y del ADN que se desea probar con el kit.

Un kit también puede estar diseñado para detectar una variedad deseada de polimorfismos de nucleótido simple, especialmente los asociados con una condición o enfermedad indeseada. Por ejemplo, un kit puede comprender, entre otros componentes, un juego o juegos de plantillas para amplificar uno o más sitios de interés asociados con la enfermedad de Huntington. Otro kit puede contener, entre otros componentes, un juego o juegos de plantillas para genes asociados con una predisposición para desarrollar diabetes tipo I o tipo II. Incluso, otro kit puede contener, entre otros componentes, un juego o juegos de plantillas para genes asociados con una predisposición para desarrollar enfermedad cardíaca. Los detalles de las utilidades de dichos kits están proveídas en la siguiente sección "Utilidades".

Utilidades

Los métodos de la invención se pueden usar siempre que se desee saber el genotipo de un individuo. El método de la invención es especialmente útil para la detección de desordenes genéticos. El método de la invención es especialmente útil como técnica no invasiva para la detección de desórdenes genéticos en un feto. En una realización preferida, el método de la invención provee un método para la identificación de polimorfismos de nucleótido simple.

En una realización preferida, el método es útil para la detección de anomalías cromosómicas que incluyen, pero sin limitarse a trisomías, monosomías, duplicaciones, eliminaciones, adiciones, redistribuciones cromosómicas, translocaciones y otras aneuploidías. El método es especialmente útil para la detección de anomalías cromosómicas en un feto.

En una realización preferida, el método de la invención provee un método para la identificación de la presencia o ausencia de una enfermedad en un feto, especialmente una enfermedad genética que surge como resultado de la presencia de una secuencia genómica, u otras condiciones biológicas que se desean identificar en un individuo al cual se le desean conocer las mismas. La identificación de dicha secuencia en el feto, con base en la presencia de dicha secuencia genómica se puede usar, por ejemplo, para determinar si el feto es un portador, o para evaluar si el feto está predispuesto a desarrollar un cierto rasgo, condición o enfermedad genética. El método de la invención es especialmente útil para las pruebas genéticas prenatales de los padres y el niño.

Los ejemplos de enfermedades que pueden ser diagnosticadas mediante esta invención, están listadas en la Tabla IV.

TABLA IV

Acondroplasia
Adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X
Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X
Síndrome de Alagille
Síndrome de retardo mental Talasemia alfa, ligado al cromosoma X
Enfermedad de Alzheimer
Enfermedad de Alzheimer, Aparición temprana familiar.
Esclerosis amiotrófica lateral general
Síndrome de insensibilidad andrógena
Síndrome de Angelman
Ataxia general, Hereditaria
Ataxia Telangiectasia
Distrofia muscular de Becker, también Distrofinopatías
Síndrome de Beckwith-Wiedeman
Talasemia beta
Deficiencia de Biotinidasa
Síndrome Branquiotorenal
Cáncer de Ovario/Seno Hereditario BRCA1 y BRCA2
Cáncer de seno
CADASIL
Enfermedad de Canavan
Cáncer
Neuropatía Hereditaria de Charcot-Marie-Tooth
Neuropatía de Charcot-Marie-Tooth Tipo 1
Neuropatía de Charcot-Marie-Tooth Tipo 2
Neuropatía de Charcot-Marie-Tooth Tipo 4
Neuropatía de Charcot-Marie-Tooth Tipo X
Enfermedad de Cockayne
Cáncer de colon
Aracnodactilia Contractual Congénita
Síndrome de Craniosinostosis (Relacionada con FGFR)
Fibrosis quística
Cistinosis

Sordera y pérdida auditiva hereditaria
DRPLA (Atrofia dentatorubral-palidoluisiana)
Síndrome de DiGeorge (también Síndrome de eliminación 22q11)
Cardiomiopatía Dilatada (ligada al cromosoma X)
Síndrome de Down (Trisomía 21)
Distrofia Muscular de Duchenne (también Las Distrofinopatías)
Distonía, aparición temprana primaria (DYT1)
Distrofinopatías
Síndrome de Ehlers-Danlos, Forma cifoescoliótica
Síndrome de Ehlers-Danlos, Tipo vascular
Epidermólisis Ampollar Simple
Exostosis Múltiple Hereditaria
Distrofia Muscular facioescapulohumeral
Trombofilia Leiden de Factor V
Poliposis adenomatosa familiar (FAP)
Fiebre Mediterránea familiar
Síndrome de X frágil
Ataxia de Friedreich
Demencia frontotemporal con Parkinsonismo-17
Galactosemia
Enfermedad de Gaucher
Hemocromatosis Hereditaria
Hemofilia A
Hemofilia B
Telangiectasia hemorrágica hereditaria
Pérdida auditiva y sordera, no sindrómica, DFNA (Connexin 26)
Pérdida auditiva y sordera, no sindrómica, DFNB 1 (Connexin 26)
Paraplejía espástica hereditaria
Síndrome de Hermansky-Pudlak
Deficiencia de Hexosaminidasa A (también Tay-Sachs)
Enfermedad de Huntington
Hipocondroplasia
Ictiosis congénita, recesiva autonómica
Incontinencia de Pigmento
Enfermedad de Kennedy (también Atrofia Muscular Espinal y

Bulbar)
Enfermedad de Krabbe
Neuropatía óptica Leber hereditaria
Leucemias de Síndrome de Lesch-Nyhan
Síndrome de Li-Fraumeni
Distrofia muscular de las cinturas de las extremidades
Deficiencia de Lipasa Lipoproteína Familiar
Lisencefalia
Síndrome de Marfan
MELAS (Encefalomiopatía mitocondriaca, acidosis láctica y episodios tipo ataque)
Monosomías
Neoplasia endocrina múltiple Tipo 2
Exostosis múltiple, Distrofia muscular hereditaria Congénita
Distrofia miotónica
Diabetes insípida nefrótica
Neurofibromatosis 1
Neurofibromatosis 2
Neuropatía con debilidad a parálisis de presión hereditaria
Enfermedad de Nieman-Pick Tipo C
Enfermedad de Norrie del Síndrome de Ruptura de Nijmegen
Albinismo oculocutáneo Tipo 1
Distrofia muscular oculofaríngea
Cáncer de ovario
Síndrome de Pallister-Hall
Enfermedad de Parkinson Juvenil Tipo Parkin
Enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher
Síndrome de Pendred
Deficiencia de Hidroxilasa Fenilalanina del síndrome de Peutz-Jeghers
Síndrome de Prader-Willi
PROP 1 – Deficiencia Hormonal Pituitaria Combinada Relacionada con (CPHD)
Cáncer de Próstata
Retinopatía pigmentaria

Retinoblastoma
Síndrome de Rothmund-Thomson
Síndrome de Smith-Lemli-Optiz
Paraplejía espástica hereditaria
Atrofia muscular espinal y bulbar (también Enfermedad de Kennedy)
Atrofia muscular espinal
Ataxia espinocerebelar Tipo 1
Ataxia espinocerebelar Tipo 2
Ataxia espinocerebelar Tipo 3
Ataxia espinocerebelar Tipo 6
Ataxia espinocerebelar Tipo 7
Síndrome de Stickler (Artrooftalmopatía hereditaria)
Tay-Sachs (también gangliosidosis GM2)
Trisomías
Esclerosis Tuberosa Compleja
Síndrome de Usher Tipo I
Síndrome de Usher Tipo II
Síndrome velocardiofacial (también Síndrome de eliminación 22q11)
Síndrome de Von Hippel-Lindau
Síndrome de Williams
Enfermedad de Wilson
Adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X
Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X
Cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X (también las Distrofinopatías)
Síndrome de Retardo Mental Facies Hipotónico ligado al cromosoma X.

El método de la invención es útil para la detección de un individuo en múltiples sitios de interés, como decenas, cientos, o incluso miles de sitios de interés asociados con un rasgo genético o enfermedad genética por medio del secuenciamiento de los sitios de interés que están asociados con el rasgo o estado de enfermedad, especialmente las más frecuentemente asociadas con dicho rasgo o condición. La invención es útil para el análisis

de un conjunto particular de enfermedades que incluyen, pero sin limitarse a enfermedad cardíaca, cáncer, desórdenes endocrinos, desórdenes inmunes, desórdenes neurológicos, desórdenes musculoesqueléticos, desórdenes oftalmológicos, anomalías genéticas, trisomías, monosomías, transversiones, translocaciones, desórdenes de la piel y enfermedades familiares.

El método de la invención también se puede usar para confirmar o identificar la relación de un ADN de secuencia desconocida con un ADN de origen o secuencia conocida, por ejemplo, para uso en las pruebas de maternidad o paternidad y similares.

Habiendo descrito la invención generalmente, esta se entenderá mejor por medio de la referencia de ciertos ejemplos específicos que están incluidos aquí para propósitos solo de ilustración, y no pretenden ser limitantes, a menos que se especifique de otra manera.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención como se definió en las reivindicaciones.

EJEMPLO 1

Las secuencias de ADN fueron ampliadas mediante PCR, en donde el paso de recocido en el ciclo 1 se realizó a una temperatura especificada, y luego se incrementó en el ciclo 2, y se incrementó adicionalmente en el ciclo 3 con el fin de reducir la amplificación no específica. La TM1 del ciclo 1 de PCR se determinó mediante el cálculo de la temperatura de fusión de la región 3', que se recoca al template de ADN de la segunda plantilla. Por ejemplo, en la FIG. 1B, la TM1 puede estar cerca de la temperatura de fusión de la región "c". La temperatura de recocido aumentó en el ciclo 2, a TM2 que estaba cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recoca al template de ADN de la primera plantilla. Por ejemplo, en la FIG. 1C, la temperatura de recocido (TM2) corresponde a la temperatura de fusión de la región "b". En el ciclo 3, la temperatura de recocido se elevó a

TM3, que está cerca de la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla. Por ejemplo, en la FIG. 1D, la temperatura de recocido (TM3) corresponde a la temperatura de fusión de la región "c" + la región "d". Los ciclos restantes de amplificación se realizaron a TM3.

Preparación del Template de ADN

El template de ADN se preparó a partir de una muestra de 5 ml de sangre obtenida por venipuntura de un voluntario humano con consentimiento. Se recolectó sangre de 36 voluntarios. El template de ADN fue aislado de cada muestra de sangre usando el Kit QIAmp ADN Blood Midi, suministrado por QIAGEN (número de catálogo 51183). Siguiendo el aislamiento, el template de ADN de cada uno de los 36 voluntarios fue recolectado para análisis adicional.

Diseño de la Plantilla

Se analizaron los siguientes cuatro polimorfismos de nucleótido simple: SNP HC21S00340, número de identificación como se asignó en la base de datos cSNP del Cromosoma Humano 21, (FIG. 3, línea 1), localizado en el cromosoma 21; SNP TSC 0095512 (FIG. 3, línea 2), localizado en el cromosoma 1; SNP TSC 0214366 (FIG. 3, línea 3), localizado en el cromosoma 1; y SNP TSC 0087315 (FIG. 3, línea 4), localizado en el cromosoma 1. Se puede acceder a la base de datos de SNP Consortium Ltd., en <http://snp.cshl.org/>, página web vigente desde Febrero 14 de 2002.

El SNP HC21S00340 se amplió usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' TAGAATAGCACTGAATTCAGGAATACAATCATTGTCAC 3' (SEC ID No: 9)

Segunda plantilla:

5' ATCACGATAAACGGCCAACTCAGGTTA 3' (SEC ID No: 10)

El SNP TSC0095512 se amplió usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' AGGTTTAGATCAGAATTCGTGAAAGCAGAAGTTGTCTG 3' (SEC ID No: 11)

Segunda plantilla:

5' TCTCCAACCTAACGGCTCATCGAGTAAAG 3' (SEC ID No: 12)

El SNP TSC0214366 se amplió usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' ATGACTAGCTATGAATTCGTTCAAGGTAGAAAATGGAA 3' (SEC ID No: 13)

Segunda plantilla:

5' GAGAATTAGAACGGCCCAAATCCCACTC 3' (SEC ID No: 14)

El SNP TSC 0087315 se amplió usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' TTACAATGCATGAATTCATCTTGGTCTCTCAAAGTGC 3' (SEC ID No: 14)

Segunda plantilla:

5' TGGACCATAAACGGCCAAAACTGTAAG 3' (SEC ID No: 16)

Todas las plantillas fueron diseñadas de forma que la región 3' fuera complementaria a cualquier secuencia aguas arriba o aguas abajo que flanquea cada sitio de interés, y que la región 5' contenga un sitio de reconocimiento de enzima de restricción. La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BceA I.

Reacción PCR

Todos los cuatro sitios de interés fueron amplificados del template de ADN genómico usando PCR (Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202). Los componentes de la reacción PCR fueron los siguientes: 40 ng de template de ADN, primera plantilla 5 μ M, segunda plantilla 5 μ M, HotStartTaq Master Mix X 1, como se obtuvo en Qiagen (No. Catálogo 203443). El HotStartTaq Master Mix contenía polimerasa de ADN, buffer de PCR, 200 μ M de cada dNTP y $MgCl_2$ 1.5 mM.

La amplificación de cada template de ADN que contenía el SNP de interés se realizó usando tres series diferentes de temperaturas de recocido, referidas aquí como la temperatura de severidad baja, temperatura de severidad media y temperatura de severidad alta. Sin importar el protocolo de temperatura de recocido, cada reacción PCR consistió de 40 ciclos de amplificación. Las reacciones PCR se realizaron usando el kit HotStartTaq Master Mix suministrado por QIAGEN. Como lo instruye el fabricante, las reacciones fueron incubadas a 95°C por 15 min., antes del primer ciclo de PCR. El paso de desnaturalización después de cada paso de extensión se realizó a 95°C por 30 seg. La reacción de recocido se realizó a una temperatura que permitía la extensión eficiente sin ningún aumento de temperatura.

La reacción de recocido de severidad baja comprendía tres temperaturas de recocido diferentes en cada uno de los tres primeros ciclos. La temperatura de recocido para el primer ciclo era de 37°C por 30 seg.; la temperatura de recocido para el segundo ciclo era de 57°C por 30 seg.; la temperatura de recocido para el tercer ciclo era de 64°C por 30 seg. El recocido se realizó a 64°C para los ciclos posteriores hasta su terminación.

Como se muestra en la fotografía del gel (FIG. 3A), se observaron múltiples bandas después de la amplificación del SNP TSC 0087315 (línea 4). La amplificación de SNP HC21S00340 (línea 1), SNP TSC0095512 (línea 2), y SNP TSC0214366 (línea 3) generaron una banda simple de alta intensidad y una banda de intensidad tenue, que era de más alto peso molecular. Cuando se usaron las condiciones de temperatura de recocido baja, se generó el producto de tamaño correcto, y este fue el producto predominante en cada reacción.

La reacción de recocido de severidad media comprendía tres temperaturas de recocido diferentes en cada uno de los tres primeros ciclos. La temperatura de recocido para el primer ciclo era de 40°C por 30 segundos; la temperatura de recocido para el segundo ciclo era de 60°C por 30 segundos; y la temperatura de recocido para el tercer ciclo era de 67°C por 30 segundos. El recocido se realizó a 67°C para los ciclos posteriores hasta su terminación. Similar a lo observado a las condiciones de recocido de severidad baja, la amplificación del SNP TSC0087315 (FIG. 3B, línea 4)

generó múltiples bandas a las condiciones de severidad media. La amplificación de los otros tres SNPs (líneas 1-3) produjo una banda simple. Estos resultados demostraron que se pueden usar temperaturas de recocido variables para amplificar limpiamente los sitios de interés del ADN genómico con una plantilla que tiene una longitud de recocido de 13 bases.

La reacción de recocido de severidad alta comprendía tres temperaturas de recocido diferentes en cada uno de los tres primeros ciclos. La temperatura de recocido para el primer ciclo era de 46°C por 30 segundos; la temperatura de recocido para el segundo ciclo era de 65°C por 30 segundos; y la temperatura de recocido para el tercer ciclo era de 72°C por 30 segundos. El recocido se realizó a 72°C para los ciclos posteriores hasta su terminación. Como se muestra en la fotografía del gel (FIG. 3C), la amplificación del SNP TSC0087315 (línea 4) usando las temperaturas de recocido de severidad alta generaron una banda simple del peso molecular correcto. Al elevar las temperaturas de recocido para cada uno de los tres primeros ciclos, se eliminó la amplificación no específica. La amplificación de SNP TSC0095512 (línea 2) generó una banda simple. Los SNPs HC21S00340 (línea 1), y SNP TSC0214366 (línea 3) fallaron la amplificación a las temperaturas de recocido de severidad alta, sin embargo, a las temperaturas de recocido de severidad media, estos SNP se amplificaron como una banda simple. Estos resultados demuestran que se pueden usar temperaturas de recocido variables para reducir los productos PCR no específicos, como se demostró para SNP TSC0087315 (FIG. 3, línea 4).

EJEMPLO 2

Se analizaron los SNPs en los cromosomas 1 (TSC0095512), 13 (TSC0264580) y 21 (HC21C00027). El SNP TSC0095512 se analizó usando dos juegos diferentes de plantillas, y el SNP HC21S00027 se analizó usando dos tipos de reacciones para la incorporación de nucleótidos.

Preparación del Template de ADN

El template de ADN se preparó a partir de una muestra de 5 ml de sangre obtenida por venipuntura de un voluntario humano con

consentimiento. El template de ADN fue aislado usando el Kit QIAmp ADN Blood Midi, suministrado por QIAGEN (número de catálogo 51183). El template de ADN se aisló siguiendo las instrucciones incluidas en el kit. Seguido del aislamiento, el template de ADN de treinta y seis voluntarios fue recolectado y cortado con la enzima de restricción EcoRI. La digestión de la enzima de restricción se realizó según las instrucciones del fabricante.

Diseño de la Plantilla

El SNP HC21S00340 se amplió por PCR usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' ATAACCGTATGCGAATTCTATAATTTTCCTGATAAAGG 3' (SEC ID No: 17)

Segunda plantilla:

5' CTAAATCAGGGGACTAGGTAAACTTCA 3' (SEC ID No: 18)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5', y la secuencia de nucleótido para la enzima de restricción EcoRI. La segunda plantilla contenía la secuencia de nucleótido para la enzima de restricción BsmF I (FIG. 4A).

Además, el SNP HC21S00340 se amplió por PCR usando la misma primera plantilla, pero con una segunda plantilla diferente, con la misma secuencia:

Segunda plantilla:

5' CTAAATCAGACGGCTAGGTAAACTTCA 3' (SEC ID No: 19)

Esta segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BceA I (FIG. 4B).

El SNP TSC0095512 se amplió por PCR usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' AAGTTTAGATCAGAATTCGTGAAAGCAGAAGTTGTCTG 3' (SEC ID No: 11)

Segunda plantilla:

5' TCTCCAACTAGGACTCATCGAGTAAAG 3' (SEC ID No: 20)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5', y contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I (FIG. 4C).

Además, el SNP TSCO095512 se amplió usando la misma primera plantilla y una segunda plantilla diferente, con la siguiente secuencia:

Segunda plantilla:

5' TCTCCAACTAACGGCTCATCGAGTAAAG 3' (SEC ID No: 12)

Esta segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BceA I (FIG. 4D).

El SNP TSC0264580, que está localizado en el cromosoma 13, se amplió usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' AACGCCGGGCGAGAATTCAGTTTTTCAACTTGCAAGG 3' (SEC ID No: 21)

Segunda plantilla:

5' CTACACATATCTGGGACGTTGGCCATCC 3' (SEC ID No: 22)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5', y tenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

Reacción PCR

Todos los sitios de interés fueron amplificados del template de ADN genómico usando la reacción en cadena de polimerasa (Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202, incorporadas aquí como referencia).

En este ejemplo, los sitios de interés fueron amplificados en tubos de reacción separados, pero también pudieron ser amplificados juntos en una reacción PCR simple. Para especificidad aumentada, se usó una PCR de "inicio caliente". Las reacciones PCR se realizaron usando el kit HotStartTaq Master Mix suministrado por Qiagen (No. Catálogo 203443). La cantidad de template de ADN y plantilla por reacción se puede optimizar para cada sitio de interés, pero en este ejemplo se usaron 40 ng de template de ADN humano genómico y 5 μ M de cada plantilla. Se realizaron 40 ciclos de PCR. Se usaron las siguientes condiciones de PCR:

- (1) 95°C por 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C por 30 segundos;
- (3) 95°C por 30 segundos;
- (4) 57°C por 30 segundos;
- (5) 95°C por 30 segundos;
- (6) 64°C por 30 segundos;
- (7) 95°C por 30 segundos;
- (8) Repetir pasos 6 y 7 treinta y nueve (39) veces;
- (9) 72°C por 5 minutos;

En el primer ciclo de PCR, la temperatura de recocido estaba cerca de la temperatura de fusión de la región de recocido 3' de las segundas plantillas, que era de 37°C. La temperatura de recocido en el segundo ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recoce al template de ADN de la primera plantilla, que era de 57°C. La temperatura de recocido en el tercer ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla, que era de 64°C. La temperatura de recocido de los ciclos restantes fue de 64°C. Escalando la temperatura de recocido de TM1 a TM2 a TM3 en los tres primeros ciclos de PCR, se mejora en gran medida la especificidad. Estas temperaturas de recocido son representativas y el experto entenderá que las temperaturas de recocido de cada ciclo son dependientes de las plantillas específicas usadas.

Las temperaturas y tiempos de desnaturalización, recocido y extensión se pueden optimizar probando diferentes ajustes y usando los

parámetros que produzcan los mejores resultados. Los productos de PCR para SNP HC21S00027 y SNP TSC095512 se muestran en las FIGS. 5A-5D.

Purificación del Fragmento de Interés

Los productos de PCR fueron separados del template de ADN genómico. Cada producto de PCR se dividió en cuatro agujeros de reacción separados en una placa Streptawell transparente de Alto Enlace, de Roche Diagnostics GmbH (número de catálogo 1 645 692, como se lista en Roche Molecular Biochemicals, Catálogo de Bioquímicos 2001). Las primeras plantillas contenían un marcador de biotina 5' de forma que los productos de PCR se enlazaron a los agujeros recubiertos de Estrptavidina, mientras que el template de ADN genómico no lo hizo. La reacción de ligamiento de estreptavidina se realizó usando un Termomezclador (Eppendorf) a 1000 rpm por 20 min., a 37°C. Cada agujero fue aspirado para remover el material no enlazado, y fue lavado tres veces con PBS 1X, con cuidadoso mezclado (Kandpal et al., Nucl. Acid Res. 18:1789-1795 (1990)); Kaneoka et al., Biotechniques 10:30-34 (1991); Green et al., Nucleic Acids Res. 18:6163-6164 (1990)).

Digestión de la enzima de restricción de los fragmentos aislados

Los productos de PCR purificados fueron digeridos con la enzima de restricción que se enlaza al sitio de reconocimiento incorporado en los productos de PCR de la segunda plantilla. Los SNP HC21S00027 (FIG. 6A y 6B) y SNP TSC0095512 (FIG. 6C y 6D) fueron amplificados en reacciones separadas usando dos segundas plantillas diferentes. La FIG. 6A (SNP HC21S00027) y FIG. 6C (SNP TSC0095512) describen los productos de PCR después de la digestión con la enzima de restricción BsmF I (New England Biolabs, número de catálogo R0572S). Las digestiones fueron realizadas en los streptawells, siguiendo las instrucciones suministradas con la enzima de restricción. El SNP TSC0264580 fue digerido con BsmF I. Después de la digestión con la enzima de restricción apropiada, los agujeros fueron lavados tres veces con PBS para remover los fragmentos clivados.

Incorporación del Nucleótido Marcado

La digestión de la enzima de restricción descrita anteriormente produjo un fragmento de ADN con una proyección 5', que contenía el sitio SNP o sitios de interés y un extremo 3' suspendido. La proyección 5' funcionó como un template que permitía la incorporación de un nucleótido o nucleótidos en presencia de una polimerasa de ADN.

Para cada SNP se realizaron cuatro reacciones de llenado; cada una de las cuatro reacciones contenía un ddATP marcado fluorescentemente diferente (ddATP, ddATP, ddATP o ddATP). Se agregaron los siguientes componentes a cada reacción de llenado: 1 μ l de un ddATP marcado fluorescentemente, 0.5 μ l de ddNTPs no marcados (40 μ M), que contenían todos los nucleótidos excepto el nucleótido que estaba marcado fluorescentemente, 2 μ l de buffer de secuencia 10X, 0.25 μ l de Secuencia, y agua según se necesite para una reacción de 20 μ l. Todas las reacciones de llenado se realizaron a 40°C por 10 min. El ddATP marcado no-fluorescentemente se compró Fermentas Inc. (Hanover, MD). Todos los otros reactivos de marcado se obtuvieron en Amersham (Kit Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Core, US 79565). En presencia de ddNTPs marcados fluorescentemente, el extremo 3' suspendido se extendió una base, que corresponde al SNP o sitio de interés (FIG. 7A-7D).

También se usó una mezcla de ddNTPs marcados y dNTPs no marcados para la reacción de "llenado" del SNP HC21S00027. Las condiciones del "llenado" fueron como se describió anteriormente, excepto que se usó una mezcla que contenía 40 μ M de dNTPs marcados, 1 μ l de ddATP marcado fluorescentemente, 1 μ l de ddATP marcado fluorescentemente, 1 μ l de ddATP marcado fluorescentemente y 1 μ l de ddATP. Los ddNTPs fluorescentes se obtuvieron en Amersham (Kit Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Core, US 79565; Amersham no publicó las concentraciones de los nucleótidos fluorescentes). El SNP HC21S00027 se digirió con la enzima de restricción BsmF I, que generó una proyección 5' de cuatro bases. Como se muestra en la FIG. 7E, si el primer nucleótido incorporado es un ddATP marcado, el extremo 3'

suspendido es llenado por una base que permite la detección del SNP o sitio de interés. Sin embargo, si el primer nucleótido incorporado es un dNTP, la polimerasa continúa incorporando nucleótidos hasta que un ddNTP es llenado. Por ejemplo, los dos primeros nucleótidos se pueden llenar con dTNPs, y el tercer nucleótido con un ddNTP que permite la detección del tercer nucleótido en la proyección. De esta forma se puede determinar la secuencia de la proyección 5' entero, lo cual aumenta la información obtenida de cada SNP o sitio de interés.

Después del marcado, cada streptawell fue lavado con PBS 1X (100 µl) tres veces. Los fragmentos de ADN "llenados" fueron luego liberados de los streptawell mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI, según las instrucciones del fabricante que fueron suministradas con la enzima (FIG. 8A-8D). La digestión se realizó por 1 hora a 37°C con agitación a 120 rpm.

Detección del Sitio de Interés

Después de la liberación de la matriz de estreptavidina, se cargaron 2-3 µl de la muestra de 10 µl, en una bandeja de membrana de 48 agujeros (The Gel Company, número de catálogo TAM48-01). La muestra en la bandeja fue absorbida con 48 Flow Membrane Comb (The Gel Company, número de catálogo AM48), y fue insertada en un gel de acrilamida al 5% (urea) de 36 cm (Bio Whittaker Molecular Applications, Long Ranger Run Gel Packs, número de catálogo 50691).

La muestra se sometió a electroforesis en el gel a 3000 voltios por 3 min. La membrane Comb fue removida, y el gel se corrió por 3 horas en una Máquina de Secuenciamiento Automatizada ABI 377. El nucleótido marcado incorporado fue detectado mediante fluorescencia.

Como se muestra en la FIG. 9A, de la muestra de treinta y seis (36) individuos, uno de los dos nucleótidos, ya sea adenosina o guanina, se detectó en SNP HC21S00027. Estos son los dos nucleótidos que se reporta que existen en SNP HC21S00027 (<http://snp.cshl.org/snpsearch.shtml>).

Uno de los dos nucleótidos, ya sea guanina o citosina, se detectó en SNP TS00095512 (FIG. 9B). Los mismos resultados se obtuvieron si el sitio de interés era amplificado con un Segunda plantilla que contenía un sitio de reconocimiento para BceA I, o la segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para BsmF I.

Como se muestra en la FIG. 9C, se detectó uno de los dos nucleótidos en SNP TSC0264580, que fue adenosina o citosina. Estos son los dos nucleótidos reportados para este sitio SNP (<http://snp.cshl.org/snpsearch.shtml>). Además, se detectó una timidina a una base del sitio de interés. En una forma dependiente de la secuencia, la BsmF I corta algunas moléculas de ADN en la posición 10/14 y las otras moléculas de ADN, que tienen la misma secuencia, se cortan en la posición 11/15. Cuando la enzima de restricción se corta a 11 nucleótidos en la dirección de la cadena, y a 15 nucleótidos en la dirección contraria de la cadena, el extremo 3' suspendido está a una base del sitio SNP. La secuencia de SNP TSC0264580 indicó que la base inmediatamente anterior al sitio SNP era una timidina. La incorporación de un ddNTP marcado en esta posición generó un fragmento una base más pequeño que el fragmento que fue cortado en la posición 10/14. De esta forma, las moléculas de ADN cortadas en la posición 11/15 proveían la información de secuencia de la base inmediatamente anterior al sitio SNP, y las moléculas de ADN cortadas en la posición 10/14 proveían la información de secuencia del sitio SNP.

El SNP HC21S00027 se amplió usando un Segunda plantilla que contenía el sitio de reconocimiento para BsmF I. Se usó una mezcla de ddNTPs marcados y dNTPs no marcados para llenar la proyección 5' generado por la digestión con BsmF I. Si se incorporaba un dNTP, la polimerasa continuaba incorporando nucleótidos hasta que un ddNTP era incorporado. Se generó una población de fragmentos de ADN, cada uno diferente en una base, que permitió determinar la secuencia total de la proyección.

Como se muestra en la FIG. 9D, se detectó una adenosina, que era complementaria al nucleótido (una timidina) inmediatamente anterior al SNP o sitio de interés. Este nucleótido se detectó debido a la propiedad de corte 11/15 de BsmF I, que está descrita anteriormente en detalle. Se detectaron

una guanina y una adenosina en el sitio SNP, que son los dos nucleótidos reportados para el sitio SNP (FIG. 9A). Los dos nucleótidos fueron detectados en el sitio SNP debido a que el peso molecular de los colorantes difiere, lo que permite la separación de los dos nucleótidos. El siguiente nucleótido detectado fue una timidina, que es complementaria al nucleótido inmediatamente aguas abajo del sitio SNP. El siguiente nucleótido detectado fue una guanina que era complementaria al nucleótido dos bases aguas abajo del sitio SNP. Finalmente, se detectó una adenosina, que era complementaria al tercer nucleótido aguas abajo del sitio SNP. La información de secuencia se obtuvo no solo para el sitio SNP sino para el nucleótido inmediatamente anterior al sitio SNP y los tres nucleótidos siguientes.

Ninguno de los sitios de interés contenía una mutación. Sin embargo, si ninguno de los sitios de interés albergaba una mutación que incluye, pero no se limita a mutación puntual, inserción, eliminación, translocación o cualquier combinación de dichas mutaciones, esta se podría identificar por comparación con la secuencia de consenso o publicada. La comparación de las secuencias atribuidas a cada uno de los sitios de interés, con la secuencia nativa no relacionada con enfermedad, del gen en cada sitio de interés, determina la presencia o ausencia de una mutación en esa secuencia. El hallazgo de una mutación en la secuencia es luego interpretada como la presencia de la enfermedad indicada, o una predisposición a desarrollar la misma, según sea apropiado, en ese individuo. Las cantidades relativas de la secuencia mutada vs. normal o no-mutada, se pueden evaluar para determinar si el sujeto tiene uno o dos alelos de la secuencia mutada, y de esta forma, determinar si el sujeto es un portador, o si la mutación indicada produce una condición dominante o recesiva.

EJEMPLO 3

Cuatro sitios de interés en el cromosoma 1 y dos sitios de interés en el cromosoma 21 fueron amplificados en reacciones PCR separadas, se recolectaron y se analizaron. Las plantillas fueron diseñadas de forma que cada sitio de interés amplificado fuera de tamaño diferente, lo que permitía la detección de los sitios de interés.

Preparación del Template de ADN

El template de ADN se preparó a partir de una muestra de 5 ml de sangre obtenida por venipuntura de un voluntario humano con consentimiento. El template de ADN fue aislado usando el Kit QIAmp ADN Blood Midi, suministrado por QIAGEN (número de catálogo 51183). El template de ADN se aisló siguiendo las instrucciones incluidas en el kit. El template de ADN fue aislado de treinta y seis voluntarios humanos, y luego fue recolectado en una muestra simple para análisis adicional.

Diseño de la Plantilla

El SNP TSC 0087315 se amplió usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' TTACAATGCATGAATTCATCTTTGGTCTCTACCAAGTGC 3' (SEC ID No: 15)

Segunda plantilla:

5' TGGACCATAAACGGCCAAAACTGTAAG 3' (SEC ID No: 16)

El SNP TSC0214366 se amplió usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' ATGACTAGCTATGAATTCGTTCAAGGTAGAAAATGGAA 3' (SEC ID No: 13)

Segunda plantilla:

5' GAGAATTAGAACGGCCCAAATCCCACTC 3' (SEC ID No: 14)

El SNP TSC 0413944 se amplió usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' TACCTTTTGATCGAATTCAAGGCCAAAAATATTAAGTT 3' (SEC ID No: 23)

Segunda plantilla:

5' TCGAACTTTAACGGCCTTAGAGTAGAGA 3' (SEC ID No: 24)

El SNP TSC0095512 se amplió usando las siguientes plantillas:

130

Primera plantilla:

5' AAGTTTAGATCAGAATTCGTGAAAGCAGAAGTTGTCTG 3' (SEC ID No: 11)

Segunda plantilla:

5' TCTCCAACCTAACGGCTCATCGAGTAAAG 3' (SEC ID No: 12)

El SNP HC21S00131 se amplió usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5'CGATTTTCGATAAGAATTCAAAAGCAGTTCTTAGTTCAG 3' (SEC ID No: 25)

Segunda plantilla:

5' TGCGAATCTTACGGCTGCATCACATTCA 3' (SEC ID No: 26)

El SNP HC21S00027 se amplió usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' ATAACCGTATGCGAATTCTATAATTTTCCTGATAAAGG 3' (SEC ID No: 17)

Segunda plantilla:

5' CTTAAATCAGACGGCTAGGTAAACTTCA 3' (SEC ID No: 19)

Para cada SNP, la primera plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI y tenía un marcador de biotina en el extremo 5'. La segunda plantilla, usada para amplificar cada SNP, contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BcaA I.

Reacción PCR

Las reacciones PCR se realizaron como se describe en el ejemplo 2, excepto que se usaron las siguientes temperaturas de recocido: la temperatura de recocido para el primer ciclo de PCR fue de 37°C por 30 segundos, la temperatura de recocido para el segundo ciclo de PCR fue de 57°C por 30 segundos y la temperatura de recocido para el tercer ciclo de PCR fue de 64°C por 30 segundos. Todos los ciclos posteriores tuvieron la misma temperatura de 64°C por 30 segundos. Se realizaron treinta y siete (37) ciclos de PCR. Después de la PCR, ¼ del volumen fue removido de cada reacción y combinado en un tubo sencillo.

Purificación del Fragmento de Interés

Los productos de PCR (ahora combinados en una muestra, y referidos como "la muestra") fueron separados del templete de ADN genómico como se describe en el Ejemplo 2, excepto que la muestra fue enlazada a un agujero simple de una placa microtituladora de Estreptavidina.

Digestión de la Enzima de Restricción de los Fragmentos Aislados

La muestra fue digerida con la enzima de restricción BceA I, que enlazó el sitio de reconocimiento de la segunda plantilla. Las digestiones de la enzima de restricción se realizaron siguiendo las instrucciones del proveedor de la enzima. Después de la digestión de la enzima de restricción, los agujeros fueron lavados tres veces con PBS 1X.

Incorporación de Nucleótidos

La digestión de la enzima de restricción descrita anteriormente produjo moléculas de ADN con una proyección 5', que contenía el sitio SNP o sitios de interés, y un extremo 3' suspendido. La proyección 5' funcionó como un templete que permitía la incorporación de un nucleótido en presencia de una polimerasa de ADN.

Se usaron los siguientes componentes para la reacción de llenado: 1 µl de ddATP marcado fluorescentemente; 1 µl de ddTTP marcado fluorescentemente; 1 µl de ddGTP marcado fluorescentemente; 1 µl de ddCTP marcado fluorescentemente; 2 µl de buffer de secuencia 10X, 0.25 µl de Secuencia, y agua según se necesite para una reacción de 20 µl. La reacción de llenado se realizó a 40°C por 10 min. Todos los reactivos de marcado se obtuvieron en Amersham (Kit Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Core, US 79565); la concentración de los ddNTPs proveída en el kit es propietaria, y no es publicada por Amersham). En presencia de ddNTPs marcados fluorescentemente, el extremo 3' suspendido se llenó una base, que corresponde al SNP o sitio de interés.

Después de la incorporación del nucleótido, el streptawell fue lavado tres veces con PBS 1X (100 µl). Los fragmentos de ADN "llenados" fueron luego liberados del streptawell mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI, siguiendo las instrucciones del fabricante. La digestión se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C con agitación a 120 rpm.

Detección del Sitio de interés

Después de la liberación de la matriz de estreptavidina, se cargaron 2-3 µl de la muestra de 10 µl, en una bandeja de membrana de 48 agujeros (The Gel Company, número de catálogo TAM48-01). La muestra en la bandeja fue absorbida con un 48 Flow Membrane Comb (The Gel Company, número de catálogo AM48), y fue insertada en un gel de acrilamida al 5% (urea) de 36 cm (Bio Whittaker Molecular Applications, Long Ranger Run Gel Packs, número de catálogo 50691).

La muestra se sometió a electroforesis en el gel a 3000 voltios por 3 min. La membrane Comb fue removida, y el gel se corrió por 3 horas en una Máquina de Secuenciamiento Automatizada ABI 377. El nucleótido marcado incorporado fue detectado mediante fluorescencia.

Las plantillas fueron diseñadas de forma que cada sitio de interés amplificado fuera de diferente tamaño. Como se muestra en la FIG. 10, cada sitio de interés amplificado difería en cerca de 5-10 nucleótidos, lo que permitió separar los sitios de interés entre sí mediante electroforesis en gel. Se detectaron dos nucleótidos para SNP TSC0087315, que eran guanina y citosina. Estos son los dos nucleótidos reportados que existen en SNP TSC0087315 (<http://snp.cshl.org/snpsearch.shtml>). La muestra comprendía template de ADN de 36 individuos, y como las moléculas de ADN que incorporaron una guanina diferían en peso molecular de las que incorporaron citosina, se observaron distintas bandas para cada nucleótido.

Se detectaron dos nucleótidos en SNP HC21S00027, que fueron guanina y adenodina (FIG. 10). Los dos nucleótidos reportados para este sitio SNP son guanina y adenosina (<http://snp.cshl.org/snpsearch.shtml>). Como se discutió anteriormente, la muestra contenía template de ADN de

treinta y seis individuos, y se esperaba que ambos nucleótidos estuvieran representados en la muestra. El peso molecular de los fragmentos de ADN que incorporaron una guanina era distinto del los fragmentos de ADN que incorporaron una adenosina, lo que permitió la detección de ambos nucleótidos.

El nucleótido citosina se detectó en SNP TSC0214366 (FIG. 10). Los dos nucleótidos que se reporta que existen en esta posición SNP son timidina y citosina (<http://snp.cshl.org/snpsearch.shtml>).

El nucleótido guanina se detectó en SNP TSC0413944 (FIG. 10). Los dos nucleótidos que se reporta que existen en este SNP son guanina y citosina.

El nucleótido citosina se detectó en SNP TS000095512 (FIG. 10). Los dos nucleótidos que se reporta que existen en este sitio SNP son guanina y citosina (<http://snp.cshl.org/snpsearch.shtml>).

El nucleótido detectado en SNP HC21S00131 fue guanina. Los dos nucleótidos que se reporta que existen en este sitio SNP son guanina y adenosina (<http://snp.cshl.org/snpsearch.shtml>).

Como se discutió anteriormente, la muestra contenía templates de ADN de treinta y seis individuos, y se esperaba que ambos nucleótidos en los sitios SNP estuvieran representados. Para SNP TSC0413944, TSC0095512, TSC0214366 y HC21S00131 uno de los dos nucleótidos fue detectado. Es probable que ambos nucleótidos reportados que existen en estos sitios SNP estén presentes en la muestra, pero que un colorante fluorescente domine al otro. El peso molecular de las moléculas de ADN que incorporaron un nucleótido no permite la separación eficiente de las moléculas de ADN que incorporaron al otro nucleótido. Sin embargo, los SNPs se separaron fácilmente entre si, y para cada SNP se incorporó un nucleótido adecuado. Se determinaron las secuencias de múltiples sitios de interés de múltiples cromosomas que fueron tratadas en una muestra simple después de la PCR.

Se llevó a cabo una reacción simple que contenía ddNTPs marcados fluorescentemente con la muestra que contenía los múltiples sitios de interés. Alternativamente, se pueden realizar cuatro reacciones de llenado separadas, en donde cada reacción contiene un nucleótido marcado fluorescentemente (ddATP, ddTTP, ddGTP o ddCTP), y ddNTPs no marcados (Ver Ejemplo 2, FIGS. 7A-7D y FIGS. 9A-C). Las cuatro reacciones de "llenado" separadas permiten la detección de cualquier nucleótido presente en los sitios de interés. Por ejemplo, si se analiza una muestra que contiene múltiples sitios de interés de un individuo simple, y dicho individuo simple es heterocigótico en uno o más sitios de interés, se pueden usar las cuatro reacciones de "llenado" separadas para determinar los nucleótidos en los sitios de interés heterocigóticos.

Además, al analizar una muestra que contiene templates de múltiples individuos, las cuatro reacciones de "llenado" separadas permitirán la detección de los nucleótidos presentes en la muestra, independiente de que tan frecuente se encuentra un nucleótido en el sitio de interés. Por ejemplo, si una muestra contiene templates de ADN de 50 individuos, y 49 de los individuos tienen una timidina en el sitio de interés, y un individuo tiene una guanina, la realización de las cuatro reacciones de "llenado" separadas, en donde cada reacción de "llenado" se corre en una línea separada o un gel, como en las FIGS. 9A-9C, permitirá la detección de la guanina. Al analizar una muestra que contiene múltiples templates de ADN, las reacciones de "llenado" múltiples aliviarán la necesidad de distinguir múltiples nucleótidos en un sitio singular de interés por medio de las diferencias en masa.

En este ejemplo se analizaron polimorfismos de nucleótido simple. También es posible determinar la presencia o ausencia de mutaciones que incluyen, pero no se limitan a mutaciones puntuales, transiciones, transversiones, translocaciones, inserciones y eliminaciones de múltiples sitios de interés. Los múltiples sitios de interés pueden ser de un cromosoma simple o de múltiples cromosomas. Los múltiples sitios de interés pueden ser de un gen simple o de múltiples genes.

La secuencia de múltiples sitios de interés que causa o predispone a un fenotipo de enfermedad se puede determinar. Por ejemplo, se puede amplificar de uno a decenas, a cientos, a miles de genes implicados con

cáncer o cualquier otra enfermedad. Las plantillas se pueden diseñar de forma que cada sitio de interés amplificado sea de diferente tamaño. Después de la PCR, los sitios de interés amplificados se pueden combinar y tratar como una muestra simple. Alternativamente, los múltiples sitios de interés se pueden amplificar en una reacción de PCR o, el número total de sitios de interés, por ejemplo 100, se puede dividir en muestras, por ejemplo 10 sitios de interés por reacción de PCR, y luego ser recolectados. Como se demuestra aquí, se puede determinar la secuencia de los múltiples sitios de interés. De esta forma, se puede determinar en una reacción la secuencia de uno a decenas, a cientos, a miles de genes que predisponen o causan un fenotipo de enfermedad.

EJEMPLO 4

La habilidad para determinar la secuencia o detectar anomalías cromosómicas de un feto usando ADN fetal libre en una muestra de una hembra embarazada que se ha dificultado por el bajo porcentaje de ADN fetal libre. Aumentando el porcentaje de ADN fetal libre se mejoraría la detección de la mutación, inserción, eliminación, translocación, transversión, monosomía, trisomía, trisomía 21, trisomía 18, trisomía 13, XXY, XXX, otras aneuploidías, eliminación, adición, amplificación, translocación y redistribución. El porcentaje de ADN fetal en el plasma obtenido de una hembra embarazada se determinó en ausencia y en presencia de inhibidores de lisis de célula. Se usó un marcador genético en el cromosoma Y para calcular el porcentaje de ADN fetal.

Preparación del Template de ADN

El template de ADN se preparó a partir de una muestra de 5 ml de sangre obtenida por venipuntura de un voluntario humano con consentimiento. La sangre fue alicuotada en dos tubos (Fischer Scientific, tubos Vacuette con 5 ml de EDTA, número de catálogo NC9897284). Se agregó formaldehído a uno de los tubos (25 µl/ml de sangre). La muestra en el otro tubo permaneció sin tratar, excepto por la presencia de EDTA. Los tubos fueron agitados a 100 rpm por diez minutos. Dos mililitros del

~~139~~

sobrenadante (el plasma) de cada muestra fueron transferidos en un nuevo tubo y se agitaron a 3000 rpm por diez minutos. Se usaron 800 µl de cada muestra para la purificación del ADN. El ADN fue aislado usando el Kit Qiagen Midi para purificación del ADN de las células de sangre (Kit QIAmp ADN Blood Midi, número de catálogo 51183). El ADN fue eluído en 100 µl de agua destilada. Se obtuvieron dos templates de ADN: uno de la muestra de sangre tratada con EDTA, y una de la muestra de sangre tratada con EDTA y formaldehído.

Diseño de la Plantilla

Se usaron dos juegos diferentes de plantillas: un juego de plantillas era específico para el cromosoma Y, y de esta forma específico para el ADN fetal, y el otro juego de plantillas se diseñó para amplificar el gen de fibrosis quística que estaba presente en el template de ADN materno y el template de ADN fetal.

En este ejemplo, la primera y segunda plantillas fueron diseñadas de forma que la secuencia entera de 5' y 3' de cada plantilla se cociera al template de ADN. En este ejemplo, el feto tenía un genotipo XY, y el cromosoma Y se usó como un marcador de la presencia del ADN fetal. Se diseñaron las siguientes plantillas para amplificar el gen SRY del cromosoma Y.

Primera plantilla:

5' TGGCGATAAAGTCAAATTCGC 3' (SEC ID No: 263)

Segunda plantilla:

5' CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT 3' (SEC ID No: 264)

Las plantillas fueron diseñadas para amplificar cualquier gen o región de una región, o cualquier parte de cualquier cromosoma se podría usar para detectar el ADN paterno y el ADN fetal. En este ejemplo, se usaron las siguientes plantillas para amplificar el gen de fibrosis quística:

Primera plantilla:

5' CTGTTCTGTGATATTATGTGTGGT 3' (SEC ID No: 265)

Segunda plantilla:

5' AATTGTTGGCATTCCAGCATTG 3' (SEC ID No: 266)

Reacción PCR

El gen SRY y el gen de fibrosis quística fueron amplificados del template de ADN genómico usando PCR (Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202). Para especificidad aumentada se usó una reacción de PCR de "inicio caliente". Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el Kit HotStarTaq Master Mix suministrado por QIAGEN (número de catálogo 203443). Para la amplificación del gen SRY, el ADN eluído en una columna de purificación Quagen se diluyó serialmente 1:2. Para la amplificación del gen de fibrosis quística, el ADN de la columna de purificación Quagen fue diluído 1:4, y luego serialmente diluído 1:2. Se usaron los siguientes componentes para cada reacción de PCR: 8 µl de template de ADN (diluido o no diluido), 1 µl de cada plantilla (5µM), 10 µl de HotStar Taq Mix. Se usaron las siguientes condiciones de PCR:

- (1) 95°C por 15'
- (2) 94°C por 1'
- (3) 54°C por 15"
- (4) 72°C por 30"
- (5) Repite pasos 2-4 por 45 ciclos
- (6) 10' a 72°C

Quantificación del ADN Fetal

Los templates de ADN que fueron eluidos en las columnas Qiagen fueron diluidos serialmente a las siguientes concentraciones: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, y 1:4096. La amplificación del gen SRY se llevó a cabo usando los templates que no estaban diluidos, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512. La amplificación del gen de fibrosis quística se llevó a cabo usando templates de ADN que estaban diluidos 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 y 1:4096. Se realizaron las mismas series de dilución con los templates de ADN que fueron purificados de la muestra de plasma tratada solo con EDTA, y la muestra tratada con EDTA y formaldehído.

144

Los resultados de las reacciones de PCR usando template de ADN que fue aislado de la muestra de plasma tratada con EDTA se muestran en el FIG. 11A. El gen SRY fue amplificado del template de ADN no diluido, y también en la muestra que fue diluida 1:2 (FIG. 11A). El gen SRY no fue amplificado en las siguientes siete diluciones seriales. Por otra parte, el gen de fibrosis quística se detectó en las diluciones seriales hasta 1:256. Se esperaba una mayor presencia del gen de fibrosis quística debido al alto porcentaje de ADN materno presente en el plasma. Se asumió que la muestra de la última dilución que proveyó la amplificación del producto gen, tenía una copia del gen de fibrosis quística o del gen SRY.

Los resultados de las reacciones de PCR usando el template de ADN que fue aislado de la muestra de plasma tratado con formaldehído y EDTA se muestran en la FIG. 11B. El gen SRY fue amplificado del template de ADN no diluido, y también en la muestra que estaba diluido a 1:2 (FIG. 11B). El gen SRY no fue amplificado en las siguientes seis diluciones. Sin embargo, en la dilución 1:256 se detectó el gen SRY. No es probable que la amplificación en la muestra 1:256 represente una señal real porque las seis series de diluciones anteriores fueron todas negativas para la amplificación de SRY. La amplificación del gen SRY en esta muestra fue probablemente un artefacto experimental producto del uso de un alto número de ciclos de PCR. Así, la muestra 1:256 no se usó para el cálculo de la cantidad de ADN fetal presente en la muestra.

La amplificación del gen de fibrosis quística se detectó en la muestra que estaba diluida 1:16 (FIG. 11B). La presencia de formalina evita la lisis de célula materna, y de este modo, hay un bajo porcentaje de ADN materno en la muestra. Este es un contraste fuerte con la muestra que fue tratada solo con EDTA y que soportó la amplificación hasta la dilución 1:256.

El porcentaje de ADN fetal presente en el plasma materno se calculó usando la siguiente formula:

$$\% \text{ ADN fetal} = (\text{cantidad de gen SRY} / \text{Cantidad de gen de fibrosis quística}) * 2 * 100$$

La cantidad de gen SRY estaba representada por el valor de la más alta dilución en la que el gen estaba amplificado. Asimismo, la cantidad de gen de fibrosis quística estaba representado por el valor de la más alta dilución en la que el gen estaba amplificado. La formula contiene una factor de multiplicación de dos (2), que se usa para normalizar el hecho de que solo hay una copia del gen SRY (localizado en el cromosoma Y), mientras que hay dos copias del gen de fibrosis quística.

Para el ejemplo anterior, el porcentaje de ADN fetal presente en la muestra que fue tratada solo con EDTA fue de 1.56% ($2/256 * 2 * 100$). El porcentaje reportado de ADN fetal presente en el plasma está entre 0.39-11.9% (Pertl and Bianchi, *Obstetrics and Gynecology*, Vol. 98, No. 3, 483-490 (2001)). El porcentaje de ADN fetal en la muestra tratada con formalina y EDTA fue de 25% ($2/16 * 2 * 100$). El experimento se repitió varias veces y cada vez la presencia de formalina aumentó el porcentaje total de ADN fetal.

Se calculó el porcentaje de ADN fetal de dieciocho muestras con y sin formalina como se describió anteriormente, con la excepción que se hicieron diluciones seriales de 1:5. Como se realizaron diluciones seriales 1:5, la última dilución serial que permitió la detección del gen SRY o del gen de fibrosis quística puede haber tenido una copia del gen o puede haber tenido 4 copias del gen. Los resultados de las dieciocho muestras con y sin formalina están resumidos en la Tabla V. El bajo rango asume que la última muestra de dilución tenía una copia de los genes, y el alto rango asume que la última dilución tenía cuatro copias de los genes.

Tabla V. Porcentaje Medio de ADN Fetal con y sin formalina

Muestra	Rango Bajo	Rango Alto
Formalina	19.47	43.69
Sin Formalina	7.71	22.1

Se alcanzó un aumento global en el ADN fetal mediante la reducción de la lisis de célula materna, reduciendo así la cantidad de ADN materno presente en la muestra. En este ejemplo se usó formaldehído para evitar la lisis de las células, sin embargo, se puede usar cualquier agente que evita la lisis de las células o aumenta la integridad estructural de las células. Se

pueden usar dos o más inhibidores de lisis de célula. El aumento en el ADN fetal en el plasma materno permite determinar la secuencia del ADN fetal, y provee la detección rápida de secuencias anormales de ADN o anomalías cromosómicas que incluyen, pero no se limitan a mutación puntual, cambio en el marco de lectura, transición, transversión, adición, inserción, eliminación, adición-eliminación, cambio de marco, sin sentido, mutación reversa, alteración microsatelital, trisomía, monosomía, otras aneuploidías, amplificación, redistribución, ~~translocación~~, transversión, eliminación, adición, amplificación, fragmento, ~~translocación~~ y redistribución.

EJEMPLO 5

Se analizó un template de ADN de un individuo con un genotipo de trisomía 21. Se analizaron tres sitios de interés en el cromosoma 13 y se analizaron dos sitios de interés en el cromosoma 21.

Preparación del Template de ADN

El template de ADN se preparó a partir de una muestra de 5 ml de sangre obtenida por venipuntura de un voluntario humano con consentimiento. El humano voluntario había sido genotipado previamente que tenía un cromosoma 21 adicional (trisomía 21). El template de ADN fue aislado usando el Kit QIAmp ADN Blood Midi, suministrado por QIAGEN (número de catálogo 51183).

Diseño de la Plantilla

Se analizaron los siguientes cinco polimorfismos de nucleótido simple: SNP TSC 0115603 localizado en el cromosoma 21; SNP TSC 03209610 localizado en el cromosoma 21; SNP TSC 0198557 localizado en el cromosoma 13; y SNP TSC 0200347 localizado en el cromosoma 13. Se usó el template de ADN de otro individuo como un control interno. El SNP TSC 0200347, que se identificó previamente como homocigótico para guanina se usó como control interno. Se puede acceder a la base de datos SNP Consortium Ltd., en la página web <http://snp.cshl.org/>, dirección en la red vigente desde el 1 de Abril de 2002.

El SNP TSC 0115603 se amplió usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' GTGCACTTACGTGAATTCAGATGAACGTGATGTAGTAG 3' (SEC ID No: 267)

Segunda plantilla:

5' TCCTCGTACTCAACGGCTTTCTCTGAAT 3' (SEC ID No: 268)

La primera plantilla estaba biotintilado en el extremo 5' y contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoR I. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BceA I.

El SNP TSC 0309610 se amplió usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' TCCGGAACACTAGAATTCTTATTTACATACACTTGT 3' (SEC ID No: 269)

Segunda plantilla:

5' CGAATAAGGTAGACGGCAACAATGAGAA 3' (SEC ID No: 270)

La primera plantilla contenía un grupo biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoR I. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BceA I.

El SNP (ss) 813773 referido (número de acceso asignado por la base de datos del NCBI SNP Referido (ss)) se amplió con las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' CGGTAAATCGGAGAATTCAGAGGATTTAGAGGAGCTAA 3' (SEC ID No: 271)

Segunda plantilla:

5' CTCACGTTTCGTTACGGCCATTGTGATAGC 3' (SEC ID No: 272)

La primera plantilla contiene un grupo biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoR I. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BceA I.

446

El SNP TSC 0198557 se amplió con las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' GGGGAAACAGTAGAATTCCATATGGACAGAGCTGTACT 3' (SEC ID No: 273)

Segunda plantilla:

5' TGAAGCTGTCTGGACGGCCTTTGCCCTCC 3' (SEC ID No: 274)

La primera plantilla contiene un grupo biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoR I. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BceA I.

El SNP TSC 0197279 se amplió con las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' ATGGGCAGTTATGAATTCACCTACTCCCTGTAGCTTGTT 3' (SEC ID No: 275)

Segunda plantilla:

5' TGATTGGCGCGAACGGCACTCAGAGAAGA 3' (SEC ID No: 276)

La primera plantilla contenía un grupo biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoR I. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BceA I.

El SNP TSC 0200347 se amplió con las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' CTCAAGGGGACCGAATTCGCTGGGGTCTTCTGTGGGTC 3' (SEC ID No: 277)

Segunda plantilla:

5' TAGGGCGGCGTGACGGCCAGCCAGTTGGT 3' (SEC ID No: 278)

La primera plantilla contenía un grupo biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoR I. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BceA I.

Reacción PCR

Todos los cinco sitios de interés fueron amplificados del template de ADN genómico usando PCR (Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202). Para especificidad aumentada se usó una reacción de PCR de "inicio caliente". Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el Kit HotStarTaq Master Mix suministrado por QIAGEN (número de catálogo 203443). La cantidad de template de ADN y plantilla por reacción se puede optimizar para cada sitio de interés; en este ejemplo se usaron 40 ng de template de ADN genómico humano y 5 μ M de cada primer. Se llevaron a cabo treinta y ocho ciclos de PCR. Se usaron las siguientes condiciones de PCR para SNP TSC 0115603, SNP TSC 0309610 y SNP TSC 02003437:

- (1) 95°C por 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 42°C por 30 segundos;
- (3) 95°C por 30 segundos;
- (4) 60°C por 30 segundos;
- (5) 95°C por 30 segundos;
- (6) 69°C por 30 segundos;
- (7) 95°C por 30 segundos;
- (8) Repite pasos 6 y 7 treinta y nueve (37) veces
- (9) 72°C por 5 minutos.

Se usaron las siguientes condiciones de PCR para SNP ss813773, SNP TSC 0198557 y SNP TSC 0197279:

- (1) 95°C por 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C por 30 segundos;
- (3) 95°C por 30 segundos;
- (4) 57°C por 30 segundos;
- (5) 95°C por 30 segundos;
- (6) 64°C por 30 segundos;
- (7) 95°C por 30 segundos;
- (8) Repite pasos 6 y 7 treinta y nueve (37) veces; y
- (9) 72°C por 5 minutos.

En el primer ciclo de cada PCR la temperatura de recocido estaba cerca de la temperatura de fusión de la región de recocido 3' de la segunda plantilla. La temperatura de recocido en el segundo ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recocce al templete de ADN de la primera plantilla. La temperatura de recocido del tercer ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla. La escalación de la temperatura de recocido de TM1 a TM2 a TM3 en los tres primeros ciclos de PCR mejora la especificidad grandemente. Estas temperaturas de recocido son representativas, y el experto entenderá que las temperaturas de recocido de cada ciclo dependen de las plantillas específicas usadas. Las temperaturas y tiempos para la desnaturalización, recocido y extensión se pueden optimizar probando varios ajustes y usando los parámetros que produjeron los mejores resultados.

Purificación del Fragmento de Interés

Los productos de PCR fueron separados de los componentes de la reacción de PCR usando el Kit de Purificación de PCR MinElute de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante (Número de catálogo 28006). Los productos de PCR fueron eluidos en 20 µl de agua destilada. Para cada SNP amplificado se mezclaron un microlitro de producto de PCR, 1 µl de ADN de control interno amplificado (SNP TSC 0200347), y 8 µl de agua destilada. Cinco microlitros de cada muestra se colocaron en dos agujeros de reacción separados en una placa microtituladore Pierce Streptawell (número de catálogo 15501). Las primeras plantillas contenían un marcador de biotina 5' de forma que los productos de PCR se enlazaron a los agujeros recubiertos de Estreptavidina, mientras que el templete de ADN genómico no lo hizo. La reacción de ligamiento de estreptavidina se realizó usando un Termomezclador (Eppendorf) a 150 rpm por 1 hora a 45°C. Cada agujero fue aspirado para remover el material no enlazado, y fue lavado tres veces con PBS 1X, con cuidadoso mezclado (Kandpal et al., Nucl. Acid Res. 18:1789-1795 (1990)); Kaneoka et al., Biotechniques 10:30-34 (1991); Green et al., Nucleic Acids Res. 18:6163-6164 (1990)).

Digestión de la enzima de restricción de los fragmentos aislados

Los productos de PCR purificados fueron digeridos con la enzima de restricción que se enlaza al sitio de reconocimiento incorporado en los productos de PCR de la segunda plantilla. Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima de restricción BceA I (New England Biolabs, número de catálogo R0623S). Las digestiones fueron realizadas en los agujeros de la placa microtituladora siguiendo las instrucciones suministradas con la enzima de restricción. Después de la digestión con la enzima de restricción apropiada, los agujeros fueron lavados tres veces con PBS para remover los fragmentos clivados.

Incorporación del Nucleótido Marcado

La digestión de la enzima de restricción descrita anteriormente produjo un fragmento de ADN con una proyección 5', que contenía el SNP y un extremo 3' suspendido. La proyección 5' funcionó como un template que permitía la incorporación de un nucleótido o nucleótidos en presencia de una polimerasa de ADN.

Para cada SNP se realizaron dos reacciones de llenado; cada reacción contenía un ddATP marcado fluorescentemente diferente (ddATP, ddATP, ddATP o ddATP, dependiendo de los nucleótidos reportados que existen en un SNP particular). Por ejemplo, se ha reportado que los nucleótidos adenina y timidina existen en SNP TSC 0115603. Por lo tanto, el producto de PCR digerido para SNP TSC 0115603 se mezcló ya sea con ddATP marcado fluorescentemente o ddATP marcado fluorescentemente. Cada reacción contenía ddATP marcado fluorescentemente para el control interno. Se agregaron los siguientes componentes a cada reacción de llenado: 2 µl de un ddATP ROX-conjugado (control interno), 2.5 µl de buffer de secuencia 10X, 2 µl de Secuencia, y agua según se necesite para una reacción de 25 µl. Todas las reacciones de llenado se realizaron a 45°C por 45 min. Sin embargo, se pueden usar períodos de incorporación más cortos. Los ddNTPs marcados no-fluorescentemente se compraron en Fermentas Inc. (Hanover, MD). Los ddNTPs ROX-conjugados se obtuvieron en Perkin

Elmer. En presencia de ddNTPs marcados fluorescentemente, el extremo 3' suspendido se extendió una base, que corresponde al SNP o sitio de interés.

Después del marcado, cada streptawell fue lavado con PBS 1X (100 μ l) tres veces. Los fragmentos de ADN "llenados" fueron luego liberados de los streptawell mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La digestión se realizó por 1 hora a 37°C con agitación a 120 rpm.

Detección de los Sitios de Interés

Después de la liberación de la matriz de estreptavidina, se cargaron 3 μ l de la muestra de 10 μ l, en una bandeja de membrana de 48 agujeros (The Gel Company, número de catálogo TAM48-01). La muestra en la bandeja fue absorbida con un 48 Flow Membrane Comb (The Gel Company, número de catálogo AM48), y fue insertada en un gel de acrilamida al 5% (urea) de 36 cm (Bio Whittaker Molecular Applications, Long Ranger Run Gel Packs, número de catálogo 50691).

La muestra se sometió a electroforesis en el gel a 3000 voltios por 3 min. La membrane Comb fue removida, y el gel se corrió por 3 horas en una Máquina de Secuenciamiento Automatizada ABI 377. El nucleótido marcado incorporado fue detectado mediante fluorescencia.

Como se muestra en la FIG. 12, el SNP TSC 0115603 fue "llenado" con ddTTP marcado (línea 1) y, en una reacción separada, con ddATP marcado (línea 3). La relación calculada entre nucleótidos, usando datos en bruto fue de 66:34, que es consistente con la relación teórica de 66:33 para un SNP en el cromosoma 21 de un individuo con trisomía 21. Ambos, ddTTP y ddATP fueron marcados con el mismo colorante fluorescente para minimizar la variabilidad en las eficiencias de incorporación de los colorantes. Sin embargo, se pueden usar nucleótidos con diferentes marcas fluorescentes o se puede usar cualquier marca detectable. Es preferible calcular los coeficientes de incorporación cuando se usan diferentes marcas.

Cada reacción de llenado se realizó en un agujero separado de forma que fuera posible la variabilidad de ligamiento de ADN entre agujeros de la placa microtituladora. Se usó un control interno para contar la variabilidad potencial de ligamiento de ADN a las placas recubiertas de estreptavidina. El control interno (SNP TSC 0200347), que es homocigótica para guanina, se agregó a la muestra antes de dividirla en dos agujeros separados, y así, una cantidad igual de control interno debe estar presente en cada agujero. La cantidad de ddGTP incorporado se puede fijar entre dos reacciones. Si la cantidad de ADN en cada agujero es igual, la cantidad de ddGTP incorporado debe ser igual debido a que la reacción se realiza a condiciones de saturación, definiendo condiciones de saturación como las condiciones que soportan la incorporación de un nucleótido en cada molécula template. La relación de ddATP a ddTTP incorporado fue de 63.4:36.6 usando el control interno. Esta relación es muy similar a la relación obtenida con los datos en bruto que indican diferencias menores en las dos reacciones de llenado en un SNP particular.

Tabla VI. Frecuencias de Alelo en Múltiples SNPs en un template de ADN de un Individuo con Trisomía 21

SNP	Alelo	Area Pico	Relación de Alelo	Control Interno	Area pico normalizada	Relación de alelo (%)
TSC 0115603	A	5599	66	723	5599	63.4
	T	2951	34	661	3227 $(723/661)*2951$	36.6
TSC 0309610	T	4126	64	1424	4126	66.8
	C	2342	36	1631	2045 $(1424/1631)*2342$	33.2
Ss 813773	A	4199	46	808	4199	41
	C	4870	54	647	6082 $((808/647)*4870)$	59
TSC 0198557	T	3385	55	719	3385	49
	C	2741	45	559	3525 $(719/559)*2741$	51
TSC 0197279	T	8085	53	2752	8085	50.7
	C	7202	47	2520	7865 $(2752/2520)*7202$	49.3

El SNP TSC 0309610 se llenó con ddTTP (línea 3) o ddCTP (línea 4) (FIG. 12). La relación calculada de nucleótidos, usando datos en bruto fue de 64:36. Ambos, ddTTP y ddCTP fueron marcados con el mismo colorante fluorescente. Después de la normalización al control interno, como se discutió anteriormente, la relación calculada de ddTTP a ddCTP fue de

66.8:33.2 (Tabla VI). De nuevo, ambas relaciones calculadas de los datos en bruto y la relación calculada usando en control interno son muy similares a la relación teórica de 66.6:33.4 para un SNP del cromosoma 21 de un individuo con trisomía.

Para demostrar que las relaciones 66:33 de nucleótidos en SNP heterocigóticos representaban sitios en los cromosomas presentes en las tres copias, se analizaron los SNPs en el cromosoma 13. El individuo de quien se obtuvo la muestra había sido previamente genotipado con un cromosoma materno 13, y un cromosoma paterno 13.

El SNP (ss) 813773 se llenó con un ddATP (línea 5) o ddCTP (línea 6) (FIG. 12). La relación calculada para los nucleótidos en este SNP heterocigótico, usando los datos en bruto fue de 46:54. Esta relación está entre el 10% de la relación esperada de 50:50. Lo que es más importante, la relación no se aproxima a la relación esperada 66:33 cuando hay una copia adicional de un cromosoma.

Después de la normalización al control interno, la relación calculada fue 41:59. Contrario al resultado esperado, la normalización al control interno aumentó la discrepancia entre la relación calculada y la relación teórica. Este resultado puede representar un error experimental que ocurrió al alicuotar las muestras de ADN.

Además, es posible que la enzima de restricción usada para generar la proyección, que se usó como un template para la reacción de llenado, corte un template de ADN preferencialmente sobre el otro template de ADN. Los dos templates difieren, con respecto al nucleótido en el sitio SNP y esto puede influenciar el corte. Las plantillas se pueden diseñar de forma que los nucleótidos adyacentes al sitio de corte sean los mismos, independiente del nucleótido en el sitio SNP (más discutido en la sección titulada "Diseño de la Plantilla").

El SNP TSC 0198557 que está en el cromosoma 13 se llenó con ddTTP (línea 7) en una reacción, y con ddCTP (línea 8) en otra (FIG. 12). La relación calculada para los nucleótidos en este SNP, usando los datos en bruto fue de 55:45. Después de la normalización al control interno, la

relación calculada de alelo T:C fue 49:51. La relación normalizada estaba más cerca de la relación teórica de 50:50 para un individuo con dos copias de cromosoma 13.

El SNP TSC 0197279 que está en el cromosoma 13 se llenó con ddTTP (línea 9) en una reacción, y con ddCTP (línea 10) en otra (FIG. 12). La relación calculada para los nucleótidos en este SNP, usando los datos en bruto fue de 53:47. Después de la normalización al control interno, la relación calculada de alelo T:C fue 50.7:49.3. Esto es consistente con la relación teórica de 50:50 para un individuo con solo dos copias de cromosoma 13.

La relación de nucleótidos en dos de los SNP analizados en el cromosoma 13 fue de aproximadamente 50:50. Un SNP, ss813773 mostró una relación de 46:54, y cuando fue normalizada al control interno, la relación fue 41:59. Estas relaciones se derivan del 50:50 esperado, pero al mismo tiempo, las relaciones no son indicadoras de un cromosoma extra, que se indica con una relación 66:33. Aunque los datos de este SNP particular no son concluyentes, esto no represente un positivo falso. No se puede sacar una conclusión de los datos de este SNP. Sin embargo, los otros dos SNPs dieron datos que indicaron un número normal de cromosomas. Es preferible analizar múltiples SNPs en un cromosoma incluyendo, pero sin limitarse a 1-5, 5-10, 10-50, 50-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, 800-900, 900-1000, 1000-2000, 2000-3000, y más de 3000. Preferiblemente, se usará el promedio de relaciones de un cromosoma particular para determinar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica. Sin embargo, aún es posible analizar un sitio de interés. En caso que se obtengan datos no concluyentes, se puede analizar otro sitio de interés.

El individuo del cual se obtuvo el template de ADN había sido previamente genotipado con trisomía 21, y las frecuencias de alelo en los SNPs del cromosoma 21 indican la presencia de un cromosoma 21 adicional. El cromosoma adicional aporta un nucleótido adicional para cada SNP, y así altera la relación tradicional 50:50 en un SNP heterocigótico. Estos resultados son consistentes para múltiples SNPs, y son específicos para los encontrados en el cromosoma 21. Las frecuencias de alelo para los

SNPs en el cromosoma 13 produjeron las relaciones esperadas de aproximadamente 50:50. Estos resultados demuestran que este método de detección de SNP se puede usar para detectar anomalías cromosómicas incluyendo, pero sin limitarse a translocaciones, transversiones, monosomías, trisomía 21, trisomía 18, trisomía 13, otras aneuploidías, eliminaciones, adiciones, ampliaciones, translocaciones y redistribuciones.

EJEMPLO 6

Se obtuvo ADN genómico de cuatro individuos después de su consentimiento. Se analizaron seis SNPs en el cromosoma 13 (TSC0837969, TSC0034767, TSC1130902, TSC0597888, TSC0195492, TSC0607185) usando el template de ADN. La información de estos SNPs se puede encontrar en la siguiente página web www.snp.chsl.org/snpsearch.shtml; página activa desde Febrero 11 de 2003.

Se usó un nucleótido simple marcado con un colorante fluorescente para genotipar los individuos en los seis sitios SNP seleccionados. Las plantillas fueron diseñadas para permitir el análisis de los seis SNPs en una reacción simple.

Preparación del Template de ADN

El template de ADN se preparó a partir de una muestra de 9 ml de sangre obtenida por venipuntura de un voluntario humano con consentimiento. El template de ADN fue aislado usando el Kit QIAmp ADN Blood Midi, suministrado por QIAGEN (número de catálogo 51183). El template de ADN se aisló siguiendo las instrucciones incluidas en el kit.

Diseño de las Plantillas

El SNP TSC0837969 se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' GGGCTAGTCTCCGAATTCCACCTATCCTACCAAATGTC 3' (SEC ID No: 30)

Segunda plantilla:

5' TAGCTGTAGTTAGGGACTGTTCTGAGCA 3' (SEC ID No: 31)

La primera plantilla tenía un marcador de biotina en el extremo 5' y contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para EcoRI. La primera plantilla se diseñó para recocerse a 44 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para BsmF I.

El SNP TSC0034767 (50) se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' CGAATGCAAGGCGAATTCGTTAGTAATAACACAGTGCA 3' (SEC ID No: 32)

Segunda plantilla:

5' AAGACTGGATCCGGGACCATGTAGAATAC 3' (SEC ID No: 33)

La primera plantilla tenía un marcador de biotina en el extremo 5' y contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para EcoRI. La primera plantilla se diseñó para recocerse a 50 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para BsmF I.

El SNP TSC1130902 (60) se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' TCTAACCATTGCGAATTCAGGGCAAGGGGGGTGAGAT 3' (SEC ID No: 34)

Segunda plantilla:

5' TGACTTGGATCCGGGACAACGACTCATCC 3' (SEC ID No: 35)

La primera plantilla tenía un marcador de biotina en el extremo 5' y contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para EcoRI. La primera plantilla se diseñó para recocerse a 60 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para BsmF I.

El SNP TSC0597888 (70) se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' ACCCAGGCGCCAGAATTCTTTAGATAAAGCTGAAGGGA 3' (SEC ID No: 36)

Segunda plantilla:

5' GTTACGGGATCCGGGACTCCATATTGATC 3' (SEC ID No: 37)

La primera plantilla tenía un marcador de biotina en el extremo 5', y contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para EcoRI. La primera plantilla se diseñó para recocerse a 70 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para BsmF I.

El SNP TSC0195492 se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' CGTTGGCTTGAGGAATTCGACCAAAGAGCCAAGAGAA (SEC ID No: 38)

Segunda plantilla:

5' AAAAAGGGATCCGGGACCTTGACTAGGAC 3' (SEC ID No: 39)

La primera plantilla tenía un marcador de biotina en el extremo 5' y contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para EcoRI. La primera plantilla se diseñó para recocerse a 80 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para BsmF I.

El SNP TSC0607185 (90) se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' ACTTGATTCCGTGAATTCGTTATCAATAAATCTTACAT 3' (SEC ID No: 40)

Segunda plantilla:

5' CAAGTTGGATCCGGGACCCAGGGCTAACC 3' (SEC ID No: 41)

La primera plantilla tenía un marcador de biotina en el extremo 5' y contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para EcoRI. La primera plantilla se diseñó para recocerse a 90 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para BsmF I.

Todos los sitios de interés fueron amplificados del template de ADN genómico usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR, Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202, incorporadas a este como referencia). En este ejemplo los sitios de interés fueron amplificados en tubos de reacción separados, pero también se pudieron haber amplificado juntos en una reacción de PCR simple. Para especificidad aumentada se usó una reacción de PCR de "inicio caliente". Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el Kit HotStarTaq Master Mix suministrado por QIAGEN (número de catálogo 203443). La cantidad de ADN y plantilla por reacción se puede optimizar para cada sitio de interés, pero en este ejemplo se usaron 40 ng de template de ADN genómico humano y 5 μ M de cada primer. Se llevaron a cabo cuarenta (40) ciclos de PCR. Se usaron las siguientes condiciones de PCR:

- (1) 95°C por 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C por 30 segundos;
- (3) 95°C por 30 segundos;
- (4) 57°C por 30 segundos;
- (5) 95°C por 30 segundos;
- (6) 64°C por 30 segundos;
- (7) 95°C por 30 segundos;
- (8) Repite pasos 6 y 7 treinta y nueve (39) veces
- (9) 72°C por 5 minutos.

En el primer ciclo de PCR la temperatura de recocido estaba cerca de la temperatura de fusión de la región de recocido 3' de las segundas plantillas, que fue de 37°C. La temperatura de recocido en el segundo ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recoce al template de ADN de la primera plantilla, que fue de 57°C. La temperatura de recocido del tercer ciclo de PCR estaba cerca de la

temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla, que fue de 64°C. La temperatura de recocido para los ciclos restantes fue de 64°C. La escalación de la temperatura de recocido de TM1 a TM2 a TM3 en los tres primeros ciclos de PCR mejora la especificidad grandemente. Estas temperaturas de recocido son representativas, y el experto entenderá que las temperaturas de recocido de cada ciclo dependen de las plantillas específicas usadas.

Las temperaturas y tiempos para la desnaturalización, recocido y extensión se pueden optimizar probando varios ajustes y usando los parámetros que produjeron los mejores resultados. En este ejemplo la primera plantilla se diseñó para recocerse a varias distancias del sitio de interés. El experto entenderá que la ubicación de recocido de la primera plantilla puede ser a 5-10, 11-15, 16-20, 21-25, 26-30, 31-35, 36-40, 41-45, 46-50, 51-55, 56-60, 61-65, 66-70, 71-75, 76-80, 81-85, 86-90, 91-95, 96-100, 101-105, 106-110, 111-115, 116-120, 121-125, 126-130, 131-140, 141-160, 161-180, 181-200, 201-220, 221-240, 241-260, 261-280, 281-300, 301-350, 351-400, 401-450, 450-500 o a más de 500 bases del sitio de interés.

Purificación del Fragmento de Interés

Los productos de PCR fueron separados del template de ADN genómico. Después de la reacción, ¼ del volumen de cada reacción de PCR de un individuo se mezclaron juntos en un agujero de una placa Streptawell transparente de Alto Enlace, de Roche Diagnostics GmbH (número de catálogo 1 645 692, como se lista en Roche Molecular Biochemicals, Catálogo de Bioquímicos 2001). Las primeras plantillas contenían un marcador de biotina 5' de forma que los productos de PCR se enlazaron a los agujeros recubiertos de Estreptavidina, mientras que el template de ADN genómico no lo hizo. La reacción de ligamiento de estreptavidina se realizó usando un Termomezclador (Eppendorf) a 1000 rpm por 20 min., a 37°C. Cada agujero fue aspirado para remover el material no enlazado, y fue lavado tres veces con PBS 1X, con cuidadoso mezclado (Kandpal et al., Nucl. Acid Res. 18:1789-1795 (1990)); Kaneoka et al., Biotechniques 10:30-34 (1991); Green et al., Nucleic Acids Res. 18:6163-6164 (1990)).

Digestión de la enzima de restricción de los fragmentos aislados

Los productos de PCR purificados fueron digeridos con la enzima de restricción BsmF I, que se enlaza al sitio de reconocimiento incorporado en los productos de PCR de la segunda plantilla. Las digestiones fueron realizadas en los streptawells, siguiendo las instrucciones suministradas con la enzima de restricción. Después de la digestión, los agujeros fueron lavados tres veces con PBS para remover los fragmentos clivados.

Incorporación del Nucleótido Marcado

La digestión de la enzima de restricción con BsmF I produjo un fragmento de ADN con una proyección 5', que contenía el sitio SNP o sitio de interés, y un extremo 3' suspendido. La proyección 5' funcionó como un template que permitía la incorporación de un nucleótido o nucleótidos en presencia de una polimerasa de ADN.

A continuación se muestra un esquema de proyección 5' para SNP TSC0837969. La secuencia entera de ADN no se reproduce, solo la porción que demuestra la proyección (en donde R indica el sitio variable)

5' TTAA				
3' AATT	R	A	C	A
Posición de la proyección	1	2	3	4

Los nucleótidos observados para TSC0837969 en la dirección de la cadena de 5' (descrita aquí como la cadena superior) son adenina y guanina. La tercera posición en la proyección en la dirección de la cadena corresponde a citosina, que es complementaria a guanina. Como este sitio variable puede ser adenina o guanina, se usó ddGTP marcado fluorescentemente en presencia de dCTP, dTTP y dATP no marcados para determinar la secuencia de ambos alelos. Las reacciones de llenado para un individuo homocigótico para guanina, homocigótico para adenina o heterocigótico se diagraman a continuación.

Homocigótico para guanina en TSC 0837969:

Alelo 1	5' TTAA	G*				
	3' AATT	C	A	C	A	
Posición de la proyección		1	2	3	4	
Alelo 2	5' TTAA	G*				
	3' AATT	C	A	C	A	
Posición de la proyección		1	2	3	4	

El ddGTP marcado es incorporado en la primera posición de la proyección. Sólo se ve una señal que corresponde a las moléculas llenadas con ddGTP marcado en la primera posición de la proyección.

Homocigótico para adenina en TSC 0837969:

Alelo 1	5' TTAA	A	T	G*		
	3' AATT	T	A	C	A	
Posición de la proyección		1	2	3	4	
Alelo 2	5' TTAA	A	T	G*		
	3' AATT	T	A	C	A	
Posición de la proyección		1	2	3	4	

El dATP no marcado es incorporado en la posición uno de la proyección, y un dTTP no marcado es incorporado en la posición dos de la proyección. El ddGTP marcado fue incorporado en la posición tres de la proyección. Sólo se ve una señal; las moléculas llenadas con ddGTP en la posición 3 tendrán un peso molecular diferente de las moléculas llenadas en la posición uno, que permite una fácil identificación de individuos homocigóticos para adenina o guanina.

Heterocigótico en TSC0837969:

Alelo 1	5' TTAA	G*				
	3' AATT	C	A	C	A	
Posición de la proyección		1	2	3	4	

Alelo 2	5' TTAA	A	T	G*	
	3' AATT	T	A	C	A
Posición de la proyección		1	2	3	4

Se verán dos señales; una señal corresponde a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 1, y una segunda señal correspondiente a las moléculas llenadas en la posición 3 de la proyección. Las dos señales se pueden separar usando cualquier técnica que separe con base en el peso molecular que incluye, sin limitarse a electroforesis en gel.

A continuación se muestra un esquema de la proyección 5' para SNP TSC0034767. La secuencia entera de ADN no se reproduce, solo la porción que muestra la proyección (en donde R indica el sitio variable)

A	C	C	R	GTGT 3'
				CACA 5'
4	3	2	1	Posición de la proyección

Los nucleótidos observados para TSC0034767 en la dirección de la cadena de 5' (descrita aquí como la cadena superior) son citosina y guanina. La segunda posición en la proyección corresponde a adenina, que es complementaria a timidina. La tercera posición en la proyección corresponde a citosina, que es complementaria a guanina. Se usó ddGTP marcado fluorescentemente en presencia de dCTP, dTTP y dATP no marcados para determinar la secuencia de ambos alelos.

En este caso, la segunda plantilla se recoce del sitio de interés, y así la reacción de llenado ocurre en la dirección contraria de la cadena (ilustrada aquí como la cadena del fondo). Cualquiera en la dirección de la cadena o en la dirección contraria, se puede llenar dependiendo de si la segunda plantilla, que contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción tipo IIS, se recoce aguas arriba o aguas abajo del sitio de interés.

A continuación se muestra un esquema de proyección 5' para SNP TSC1130902. La secuencia entera de ADN no se reproduce, solo la porción que muestra la proyección (en donde R indica el sitio variable)

ALA

	5' TTCAT			
	3' AAGTA	R	T	C C
Posición de la proyección		1	2	3 4

Los nucleótidos observados para TSC1130902 en la dirección de la cadena de 5' (ilustrados aquí como la cadena superior) son adenina y guanina. La segunda posición en la proyección corresponde a timidina, y la tercera posición en la proyección corresponde a citosina, que es complementaria a guanina. Se usó ddGTP marcado fluorescentemente en presencia de dCTP, dTTP y dATP no marcados para determinar la secuencia de ambos alelos.

A continuación se muestra un esquema de la proyección 5' para SNP TSC0597888. La secuencia entera de ADN no se reproduce, solo la porción que muestra la proyección (en donde R indica el sitio variable)

T	C	T	R	ATTC 3'
				TAAG 5'
4	3	2	1	Posición de la proyección

Los nucleótidos observados para TSC0597888 en la dirección de la cadena de 5' (descrita aquí como la cadena superior) son citosina y guanina. La tercera posición en la proyección corresponde a citosina, que es complementaria a guanina. Se usó ddGTP marcado fluorescentemente en presencia de dCTP, dTTP y dATP no marcados para determinar la secuencia de ambos alelos.

A continuación se muestra un esquema de la proyección 5' para SNP TSC0607185. La secuencia entera de ADN no se reproduce, solo la porción que muestra la proyección (en donde R indica el sitio variable)

C	C	T	R	TGTC 3'
				ACAG 5'
4	3	2	1	Posición de la proyección

Los nucleótidos observados para TSC0607185 en la dirección de la cadena de 5' (descrita aquí como la cadena superior) son citosina y timidina.

En este caso, la segunda plantilla se recoge del sitio de interés que permite que la dirección contraria de la cadena sea llenada. La dirección contraria de la cadena (descrita aquí como cadena de fondo) será llenada con guanina o adenina.

La segunda posición en la proyección 5' es timidina, que es complementaria a adenina, y la tercera posición en la proyección corresponde a citosina, que es complementaria a guanina. Se usó ddGTP marcado fluorescentemente en presencia de dCTP, dTTP y dATP no marcados para determinar la secuencia de ambos alelos.

A continuación se muestra un esquema de proyección 5' para SNP TSC0195492. La secuencia entera de ADN no se reproduce, solo la porción que muestra la proyección.

	5' ATCT				
	3' TAGA	R	A	C	A
Posición de la proyección		1	2	3	4

Los nucleótidos observados en este sitio son citosina y guanina (ilustrados aquí como la cadena superior). La segunda posición en la proyección 5' es adenina, que es complementaria a timidina, y la tercera posición en la proyección corresponde a citosina, que es complementaria a guanina. Se usó ddGTP marcado fluorescentemente en presencia de dCTP, dTTP y dATP no marcados para determinar la secuencia de ambos alelos.

Como se demostró anteriormente, la secuencia de ambos alelos de los seis SNPs se puede determinar mediante el marcado con ddGTP en presencia de dATP, dTTP y dCTP no marcados. Se agregaron los siguientes componentes a cada reacción de llenado: 1 µl de ddGTP marcado fluorescentemente, 0.5 µl de ddNTPs no marcados (40 µM), que contenían todos los nucleótidos excepto guanina, 2 µl de buffer de secuenasa 10X, 0.25 µl de Secuenasa, y agua según se necesite para una reacción de 20 µl. La reacción de llenado se realizó a 40°C por 10 min. El ddNTP marcado no-fluorescentemente se compró en Fermentas Inc. (Hanover, MD). Todos los

otros reactivos de marcado se obtuvieron en Amersham (Kit Thermo Sequenase Dye Terminador Cycle Sequencing Core, US 79565).

Después del marcado, cada streptawell fue lavado con PBS 1X (100 µl) tres veces. Los fragmentos de ADN "llenados" fueron luego liberados de los streptawell mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI, según las instrucciones del fabricante que fueron suministradas con la enzima. La digestión se realizó por 1 hora a 37°C con agitación a 120 rpm.

Detección del Sitio de Interés

Después de la liberación de la matriz de estreptavidina, la muestra fue cargada en una línea de un gel de acrilamida al 5% (urea) de 36 cm (Bio Whittaker Molecular Applications, Long Ranger Run Gel Packs, número de catálogo 50691). La muestra se sometió a electroforesis en el gel a 3000 voltios por 3 min. El gel se corrió por 3 horas en un aparato de secuenciamiento (Hoefer SQ3 Sequencer). El gel fue removido del aparato y fue rastreado en el Typhoon 9400 Variable Mode Imager. El nucleótido marcado incorporado fue detectado mediante fluorescencia.

Como se muestra en la FIG. 11, el template de ADN en las líneas 1 y 2 para SNP TSC0837969 es homocigótico para adenina. Se esperaba que ocurriera la reacción de llenado si el individuo era homocigótico para adenina:

Homocigótico para adenina en TSC 0837969:

5' TTAA	A	T	G*	
3' AATT	T	A	C	A
Posición de la proyección	1	2	3	4

El dATP no marcado fue incorporado en la primera posición complementaria a la proyección. El dTTP no marcado fue incorporado en la segunda posición complementaria a la proyección. El ddGTP marcado fue incorporado en la tercera posición complementaria a la proyección. Solo se ve una banda que migró a aproximadamente la posición 46 del gel de

acrilamida. Esto indicó que la adenina era el nucleótido llenado en la posición uno. Si el nucleótido guanina hubiera sido llenado, se esperaría una banda en la posición 44.

Sin embargo, el template de ADN en las líneas 3 y 4 para SNP TSC0837969 era heterocigótico. Se esperaban las siguientes reacciones de llenado si el individuo era heterocigótico:

Heterocigótico en TSC 0837969:

Alelo 1	5' TTAA	G*				
	3' AATT	C	A	C	A	
Posición de la proyección		1	2	3	4	
Alelo 2	5' TTAA	A	T	G*		
	3' AATT	T	A	C	A	
Posición de la proyección		1	2	3	4	

Se vieron dos bandas distintas; una banda corresponde a las moléculas llenadas con ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección (el aleo G), y la segunda banda corresponde a las moléculas llenadas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección (el alelo A). Las dos bandas fueron separadas con base en las diferencias en peso molecular usando electroforesis en gel. Se usó un nucleótido ddGTP marcado fluorescentemente para determinar que un individuo era heterocigótico en un sitio SNP. Este es el primer uso de un nucleótido simple para detectar efectivamente la presencia de los alelos diferentes.

Para SNP TSC0034767, el template de ADN en las líneas 1 y 3 es heterocigótico para citosina y guanina, como se evidencia por las dos bandas distintas. La banda inferior correspondía a ddGTP llenado en la posición 1 complementaria a la proyección. La segunda banda de peso molecular ligeramente más alto, correspondía al ddGTP llenado en la posición 3, indicando que la primera posición en la proyección estaba llena con dCTP no marcado, lo que permitió que la polimerasa continuara incorporando nucleótidos hasta que incorporara ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección. El template de ADN en las líneas 2 y 4 era

homocigótico para guanina, como se evidenció por medio de una banda simple de peso molecular más alto que si se hubiera llenado ddGTP en la primera posición complementaria a la proyección.

Para SNP TSC1130902, el template de ADN en las líneas 1, 2 y 3 es homocigótico para adenina en el sitio variable, como se evidencia por una banda simple de peso molecular más alto que migraba en la posición aproximadamente 62 del gel. El template de ADN en línea 3 es heterocigótico en el sitio variable, como lo indica la presencia de dos bandas distintas. La banda inferior corresponde a moléculas llenadas con ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección (el alelo de guanina). La banda de peso molecular más alto corresponde a las moléculas llenadas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección (el alelo de adenina).

Para SNP TSC0597888, el template de ADN en las líneas 1 y 4 era homocigótico para citosina en el sitio variable; el template de ADN en la línea 2 era heterocigótico en el sitio variable, y el template de ADN en la línea 3 era homocigótico para guanina. Las reacciones de llenado esperadas están diagramadas a continuación:

Homocigótico para citosina:

Alelo 1	T	C	T	G	ATTC 3'
		G*	A	C	TAAG 5'
	4	3	2	1	Posición de la proyección
Alelo 2	T	C	T	G	ATTC 3'
		G*	A	C	TAAG 5'
	4	3	2	1	Posición de la proyección

Homocigótico para guanina:

Alelo 1	T	C	T	C	ATTC 3'
				G*	TAAG 5'
	4	3	2	1	Posición de la proyección

Alelo 2	T	C	T	C	ATTC 3'
				G*	TAAG 5'
	4	3	2	1	Posición de la proyección

Homocigótico para guanina/citosina:

Alelo 1	T	C	T	G	ATTC 3'
		G*	A	C	TAAG 5'
	4	3	2	1	Posición de la proyección

Alelo 2	T	C	T	C	ATTC 3'
				G*	TAAG 5'
	4	3	2	1	Posición de la proyección

El templete de ADN homocigótico para guanina en el sitio variable mostró una banda simple, que correspondía a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección. Estas moléculas de ADN eran de peso molecular más bajo comparado con las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 3 de la proyección (ver línea 3 para SNP TSC0597888). Las moléculas de ADN diferían dos bases en peso molecular. El templete de ADN homocigótico para citosina en el sitio variable mostró una banda simple, que corresponde a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección. Estas moléculas de ADN migraron a un peso molecular más alto que las moléculas llenadas con ddGTP en la posición 1 (ver líneas 1 y 4 para SNP TSC0597888).

El ADN heterocigótico en el sitio variable mostró dos bandas; una banda correspodía a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección que era de peso molecular más bajo, y la segunda banda corresondía a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección, y que era de peso molecular más alto (ver línea 3 para SNP TSC0597888).

Para SNP TSC 0195492, el templete de ADN el las líneas 1 y 3 era heterocigótico en el sitio variable se demostró por la presencia de dos

~~164~~

bandas distintas. El template de ADN en la línea 2 era homocigótico para guanina en el sitio variable. El template de ADN en la línea 4 era homocigótico para citosina. Solo se vio una banda en la línea 4 para este SNP, y tenía un peso molecular más alto que las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección (comparar líneas 2, 3 y 4).

Los alelos observados para SNP TSC0607185 son reportados como citosina y timidina. Por consistencia, el consorcio de SNP denota los alelos observados como aparecen en la dirección de la cadena www.snp.cshl.org/shpsearch.shtml; página web activa desde Febrero 11 de 2003). Para este SNP, la segunda plantilla se coció en el sitio de interés, que permitió que la reacción de llenado ocurriera en la dirección contraria de la cadena después de la digestión con BsmF I.

El template de ADN en las líneas 1 y 3 era heterocigótico; el template de ADN en la línea 2 era homocigótico para timidina, y el template de ADN en la línea 4 era homocigótico para citosina. La dirección contraria de la cadena fue llenada con ddGTP, de forma que el nucleótido en la dirección de la cadena correspondía a citosina.

Se pueden usar marcadores de peso molecular para identificar las posiciones de las bandas esperadas. Alternativamente, para cada SNP analizado se puede usar una muestra de heterocigótico conocida, la cual identificará precisamente la posición de las dos bandas esperadas.

Como se muestra en la FIG: 11, se puede usar un nucleótido con un colorante fluorescente para determinar la identidad de un sitio variable, incluyendo, pero sin limitarse a SNPs y mutaciones de nucleótido simple. Típicamente, para determinar si un individuo es homocigótico o heterocigótico en un sitio SNP, se realizan múltiples reacciones usando un nucleótido marcado con un colorante y un segundo nucleótido marcado con un segundo colorante. Sin embargo, esto trae problemas en la comparación de resultados porque los dos colorantes tienen diferentes coeficientes cuánticos. Incluso si diferentes nucleótidos son marcados con el mismo colorante, los coeficientes cuánticos son diferentes. El uso de un nucleótido

simple marcado con un colorante elimina cualquier error de los coeficientes de cuánticos de los colorantes diferentes.

En este ejemplo se usó ddGTP marcado fluorescentemente. Sin embargo, el método es aplicable para un nucleótido marcado con cualquier mitad que genere una señal incluyendo, pero sin limitarse a molécula radiactiva, molécula fluorescente, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, hapteno, carbohidrato, biotina, derivado de biotina, mitad fosforescente, mitad luminescente, mitad electroquimiluminescente, mitad cromática, mitad que tiene una resonancia detectable de giro electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductividad eléctrica. Además se pueden usar ddATP, ddTTP o ddCTP marcados.

El ejemplo anterior usó la tercera posición complementaria a la proyección como un indicador del segundo alelo. Sin embargo también se puede usar la segunda o cuarta posición (ver Sección acerca de Incorporación de Nucleótidos). Además, la proyección fue generada con la enzima de restricción tipo IIS BsmF I; sin embargo, se puede usar cualquier enzima que corte el ADN a una distancia de su sitio de ligamiento, que incluye pero no se limita a las enzimas listadas en la Tabla I.

Adicionalmente, en el ejemplo anterior, el nucleótido inmediatamente anterior al sitio SNP no era guanina en la cadena que fue llenada. Esto eliminó cualquier efecto de las propiedades de corte alternativo de la enzima de restricción tipo IIS a ser removida. Por ejemplo, en SNP TSC0837969, el nucleótido del sitio SNP en la dirección de la cadena era una adenina. Si BsmF I mostró propiedades de corte alternativas, se hubieran generado las siguientes proyecciones para el alelo de adenina y el alelo de guanina:

Alelo G – Corte 11/15	5' TTA				
	3' AAT	T	C	A	C
	Posición de la proyección	0	1	2	3
Alelo G – después del llenado	5' TTA	A	G*		
	3' AAT	T	C	A	C
	Posición de la proyección	0	1	2	3

Alelo A – Corte 11/15	5' TTA				
	3' AAT	T	T	A	C
Posición de la proyección		0	1	2	3
Alelo A – después del llenado	5' TTA	A	A	T	G*
	3' AAT	T	T	A	C
Posición de la proyección		0	1	2	3

Para el alelo de guanina, la primera posición en la proyección sería llenada con dATP, que permitiría que la polimerasa incorporara ddGTP en la posición 2 complementaria a la proyección. No habría diferencia detectable entre las moléculas cortadas en la posición 10/14 o en las moléculas cortadas en la posición 11/15.

Para el alelo de adenina, la primera posición complementaria a la proyección se llenaría con dATP, la segunda posición se llenaría con dATP, la tercera posición se llenaría con dTTP, y la cuarta posición se llenaría con ddGTP. No habría diferencia en los pesos moleculares de las moléculas cortadas en 10/14 o las moléculas cortadas en 11/15. Las únicas diferencias corresponderían a si las moléculas de ADN contenían una adenina en el sitio variable o una guanina en el sitio variable.

Como se ve en la FIG. 11, el posicionamiento de la región de recocido de la primera plantilla permite analizar múltiples SNPs en una línea simple o en un gel. Además, cuando se usa el mismo nucleótido con el mismo colorante, se puede llevar a cabo una reacción de llenado simple. En este ejemplo, se analizaron 6 SNPs en una línea. Sin embargo, se puede analizar cualquier número de SNPs incluyendo, pero sin limitarse a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 30-40, 410-50, 510-60, 610-70, 710-80, 810-100, 1010-120, 1210-140, 1410-160, 1610-180, 1810-200, y más de 200 en una reacción simple.

Además, un nucleótido marcado usado para detectar ambos alelos se puede mezclar con un segundo nucleótido marcado usado para detectar un juego diferente de SNPs siempre y cuando ninguno de los nucleótidos que

170

están marcados se encuentre inmediatamente antes del sitio variable (complementario al nucleótido en la posición 0 del corte 11/15). Por ejemplo, suponer que SNP X puede ser guanina o timidina en el sitio variable, y tiene la siguiente proyección, generada después de la digestión con BsmF I:

SNP X 10/14	5' TTGAC				
Alelo G	3' AACTG	C	A	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4
SNP X 11/15	5' TTGA				
Alelo G	3' AACT	G	C	A	C
Posición de la proyección		0	1	2	3
SNP X 10/14	5' TTGAC				
Alelo T	3' AACTG	A	A	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4
SNP X 11/15	5' TTGA				
Alelo T	3' AACT	G	A	A	C
Posición de la proyección		0	1	2	3

Después de la reacción de llenado con ddGTP marcado, dATP, dTTP y dCTP no marcados, se generarían las siguientes moléculas:

SNP X 10/14	5' TTGAC	G*			
Alelo G	3' AACTG	C	A	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4
SNP X 11/15	5' TTGA	C	G*		
Alelo G	3' AACT	G	C	A	C
Posición de la proyección		0	1	2	3
SNP X 10/14	5' TTGAC	T	T	G*	
Alelo T	3' AACTG	A	A	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

SNP X 11/15	5' TTGA	C	T	T	G*
Alelo T	3' AACT	G	A	A	C
Posición de la proyección		0	1	2	3

Ahora supoga que el SNP Y puede ser adenina o timidina en el sitio variable, y tiene las siguientes proyecciones 5' generadas después de la digestión con BsmF I.

SNP Y 10/14	5' GTTT				
Alelo A	3' CAAA	T	G	T	A
Posición de la proyección		1	2	3	4

SNP Y 11/15	5' GTT				
Alelo A	3' CAAA	T	G	T	
Posición de la proyección		0	1	2	3

SNP Y 10/14	5' GTTT				
Alelo T	3' CAAA	A	G	T	A
Posición de la proyección		1	2	3	4

SNP Y 11/15	5' GTT				
Alelo T	3' CAAA	A	G	T	
Posición de la proyección		0	1	2	3

Después del llenado con ddATP marcado y dCTP, dGTP y dTTP no marcados, se generarían las siguientes moléculas:

SNP Y 10/14	5' GTTT	A*			
Alelo A	3' CAAA	T	G	T	A
Posición de la proyección		1	2	3	4

SNP Y 11/15	5' GTT	T	A*		
Alelo A	3' CAAA	T	G	T	
Posición de la proyección		0	1	2	3

SNP Y 10/14	5' GTTT	T	C	A*	
Alelo T	3' CAAA	A	G	T	A
Posición de la proyección		1	2	3	4
SNP Y 11/15	5' GTT	T	T	C	A*
Alelo T	3' CAAA	A	G	T	
Posición de la proyección		0	1	2	3

En este ejemplo, se usan ddGTP marcado y ddATP marcado para determinar la identidad de ambos alelos de SNP X y SNP Y respectivamente. El nucleótido inmediatamente anterior (el nucleótido complementario en la posición 0 de la proyección del SNP X cortado en 11/15 no es guanina o adenina en la cadena que es llenada. Asimismo, el nucleótido inmediatamente anterior a SNPY no es guanina o adenina en la cadena que es llenada. Esto permite que ocurra la reacción de llenado para ambos SNPs en una reacción simple con ddGTP marcado, ddATP marcado y dCTP y dTTP no marcados. Esto reduce el número de reacciones que se necesitan llevar a cabo, e incrementa el número de SNPs que se pueden analizar en una reacción.

Las primeras plantillas de cada SNP se pueden diseñar para recocerse a diferentes distancias del sitio de interés, lo que permite que los SNPs migren en diferentes posiciones del gel. Por ejemplo, la primera plantilla usada para amplificar el SNP X se puede recocer a 30 bases del sitio de interés, y la primera plantilla usada para amplificar el SNP Y se puede recocer a 35 bases del sitio de interés. Además, los nucleótidos se pueden marcar con colorantes fluorescentes que emiten en espectros que no se traslapan. Después de la corrida del gel, el gel puede ser rastreado en una longitud de onda específica para un colorante. Solo aquellas moléculas marcadas con ese colorante emitirán una señal. Luego, el gel puede ser rastreado a una longitud de onda del segundo colorante. Solo aquellas moléculas marcadas con ese colorante emitirán una señal. Este método permite la máxima compresión del número de SNPs que se pueden analizar en una reacción simple.

En este ejemplo, el nucleótido que precede el sitio variable de la cadena que fue llenada no era adenina o guanina, y el nucleótido siguiente

al sitio variable no puede ser adenina o guanina en la dirección de la cadena. Este método puede trabajar con cualquier combinación de nucleótidos marcados y el experto entenderá cuales reacciones de marcado se pueden mezclar y cuales no. Por ejemplo, si un SNP está marcado con timidina y un segundo SNP está marcado con citosina, los SNPs pueden ser marcados en una reacción simple, si el nucleótido inmediatamente anterior de cada sitio variable no es timidina o citosina en la dirección de la cadena, y el nucleótido inmediatamente siguiente después del sitio variable no es timidina o citosina en la dirección de la cadena.

/11/

Este método permite que las señales de un alelo sean comparadas con la señal de un segundo alelo sin la complejidad adicional para la determinación del grado de corte alternativo, o corregir los coeficientes cuánticos de los colorantes. Este método es especialmente útil cuando se trata de cuantificar la relación de un alelo a otro. Por ejemplo, este método es útil para la detección de anomalías cromosómicas. Se espera que la relación de alelos en un sitio heterocigótico esté cerca de 1:1 (un alelo A a un Alelo G). Sin embargo, si un cromosoma extra está presente, se espera que la relación sea aproximadamente 1:2 (un alelo A y dos alelos G o 2 alelos A y 1 alelo G). Este método es especialmente útil cuando se trata de detectar ADN fetal en presencia de ADN materno.

En adición, este método es útil para detectar dos señales genéticas en una muestra. Por ejemplo, este método puede detectar células mutantes en presencia de células tipo nativas (ver Ejemplo 5). Si una célula mutante contiene una mutación en la secuencia de ADN de un gen particular, este método se puede usar para detectar ambas señales, la señal mutante y la señal tipo nativa. Este método se puede usar para detectar la secuencia de ADN mutante en presencia de la secuencia de ADN tipo nativa. La relación de ADN mutante a ADN tipo nativo se puede cuantificar porque usa un nucleótido simple marcado con una mitad que genera una señal.

EJEMPLO 7

Métodos no invasivos para la detección de varios tipos de cáncer tienen el potencial de reducir la morbilidad y mortalidad de una enfermedad.

374

Se han desarrollado varias técnicas para la detección temprana de tumores colaterales incluyendo colonoscopias, enemas de bario y sigmoidoscopia; sin embargo, las técnicas están limitadas en uso porque son invasivas, lo que causa una baja tasa de conformidad en el paciente. Pruebas genéticas no invasivas pueden ser útiles en la identificación de tumores colorrectales en estado temprano.

En 1991, los investigadores identificaron el gen Poliposis Cólica Adenomatosa (APC), que juega un papel crítico en la formación de tumores colorrectales (Kinzler *et al.*, Science 253:661-665, 1991). El gen APC reside en el cromosoma 5q21-22, y un código total de 15 exones para una molécula de RNA de 8529 nucleótidos, que produce una proteína 300 Kd APC. La proteína se expresa en numerosos tipos de células, y es esencial para la adhesión de células.

Las mutaciones en el gen APC generalmente inicia la neoplasia colorrectal (Tsao, J. *et al.*, Am. J. Pathol. 145:531-534, 1994). Aproximadamente el 95% de las mutaciones en el gen de APC produce mutaciones sin sentido/cambio de marco. Las mutaciones más comunes se encuentran en los codones 1601 y 1309; las mutaciones de estos codones suman 1/3 de todas las mutaciones germinales. Con respecto a las mutaciones somáticas, el 60% se encuentran en los codones 1286-1513, que es aproximadamente el 10% de la secuencia de codificación. Esta región es denominada la Región de Agrupamiento de mutación (MCR). Se han identificado numerosos tipos de mutaciones en el gen APC incluyendo sustituciones de nucleótido (ver Tabla VII), errores de empalme (ver tabla VIII), eliminaciones pequeñas (ver tabla IX), inserciones pequeñas (ver tabla X), pequeñas inserciones/eliminaciones (Ver Tabla XI), eliminaciones gruesas (ver Tabla XII), inserciones gruesas (ver Tabla XIII) y redistribuciones complejas (ver Tabla XIV).

Los investigadores han intentado identificar células que albergan mutaciones en el gen APC en muestras de deposiciones (Traversa, G. *et al.*, New England Journal of Medicine, Vol 346:311-320, 2002). Aunque se encontraron mutaciones APC en la mayoría de los tumores, aproximadamente 1 en 250 células en la muestra de deposiciones tiene una mutación en el gen APC; la mayoría de las células son células normales que

han sido liberadas en las heces. Además, el ADN humano representa aproximadamente una billonésima del ADN total encontrado en las muestras de deposiciones; la mayoría del ADN es bacterial. La técnica usada por Traversa *et al.*, solo detecta mutaciones que se producen en una proteína truncada.

Como se discutió anteriormente, numerosas mutaciones en el gen APC han estado implicadas en la formación de tumores colorrectales. Así, existe una necesidad de una técnica altamente sensible, no invasiva para la detección de tumores colorrectales. A continuación se describen los métodos para la detección de dos mutaciones en el gen APC. Sin embargo, se puede analizar cualquier número de mutaciones usando los métodos descritos aquí.

Preparación del Template de ADN

El template de ADN es purificado de una muestra que contiene células del colon que incluye, pero no se limita a la muestra de deposición. El template de ADN es purificado usando los procedimientos descritos por Ahlquist *et al.* (Gastroenterology, 119:1219-1227, 2000). Si las muestras de deposición están congeladas, las muestras son descongeladas a temperatura ambiente, y son homogenizadas con un agitador de deposiciones Exactor (Exat Laboratorios, Maynard, Mass.). Siguiendo la homogenización, un equivalente de deposición de 4 gramos de cada muestra es centrifugado a 2536 x g por 5 minutos. Las muestras son centrifugadas una segunda vez a 16,500 x g por 10 minutos. Los sobrenadantes son incubados con 20 µl de RNasa (0.5 mg por mililitro) por 1 hora a 37°C. El ADN es precipitado con 1/10 de volumen de 3 moles de acetato de sodio por litro y un volumen igual de isopropanol. El ADN es disuelto en 5 ml de TRIS-EDTA (0.01 mol de Tris por litro (pH 7.4) y 0.001 mol de EDTA por litro).

Diseño de las Plantillas

Para determinar si una mutación reside en el codón 1370 se usan las siguientes plantillas:

Primera plantilla

5' GTGCAAAGGCCTGAATTCCCAGGCACAAAGCTGTTGAA 3' (SEC ID No: 42)

Segunda plantilla

5' TGAAGCGAACTAGGGACTAGGTGGACTT (SEC ID No: 43)

La primera plantilla contiene un marcador de biotina en el extremo 5', y la secuencia de nucleótido para la enzima de restricción EcoRI. La segunda plantilla contiene la secuencia de nucleótido para la enzima de restricción para BsmF I.

Para determinar si existe una pequeña eliminación en el codón 1302 se usaron las siguientes plantillas:

Primera plantilla

5' GATTCCGTAAACGAATTCAGTTCATTATCATCTTTGTC 3' (SEC ID No: 44)

Segunda plantilla

5' CCATTGTTAAGCGGGACTTCTGCTATTTG 3' (SEC ID No: 45)

La primera plantilla tiene un marcador de biotina en el extremo 5', y contiene un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para EcoRI. La segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para BsmF I.

Reacción de PCR

Los sitios de interés son amplificados del template de ADN genómico usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR, Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202, incorporadas a este como referencia). Los sitios de interés son amplificados en tubos de reacción separados; estos también se pueden amplificar juntos en una reacción de PCR simple. Para especificidad aumentada se usó una reacción de PCR de "inicio caliente", e.g., mediante el uso del Kit HotStarTaq Master Mix suministrado por QIAGEN (número de catálogo 203443). La cantidad de ADN y plantilla por reacción es optimizada para cada sitio de interés, pero en este ejemplo se usaron 40 ng de template de ADN genómico humano y 5 μ M de cada plantilla. Se llevaron a cabo cuarenta (40) ciclos de PCR. Se usaron las siguientes condiciones de PCR:

- (1) 95°C por 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C por 30 segundos;
- (3) 95°C por 30 segundos;
- (4) 57°C por 30 segundos;
- (5) 95°C por 30 segundos;
- (6) 64°C por 30 segundos;
- (7) 95°C por 30 segundos;
- (8) Repite pasos 6 y 7 treinta y nueve (39) veces
- (9) 72°C por 5 minutos.

En el primer ciclo de PCR la temperatura de recocido está cerca de la temperatura de fusión de la región de recocido 3' de las segundas plantillas, que es de 37°C. La temperatura de recocido en el segundo ciclo de PCR está cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recoce al templete de ADN de la primera plantilla, que es de 57°C. La temperatura de recocido del tercer ciclo de PCR está cerca de la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla, que es de 64°C. La temperatura de recocido para los ciclos restantes es de 64°C. La escalación de la temperatura de recocido de TM1 a TM2 a TM3 en los tres primeros ciclos de PCR mejora la especificidad grandemente. Estas temperaturas de recocido son representativas, y el experto entenderá que las temperaturas de recocido de cada ciclo dependen de las plantillas específicas usadas.

Las temperaturas y tiempos para la desnaturalización, recocido y extensión se pueden optimizar probando varios ajustes y usando los parámetros que produjeron los mejores resultados.

Purificación del Fragmento de Interés

Los productos de PCR fueron separados del templete de ADN genómico. Cada producto de PCR es dividido en cuatro agujeros separados de una placa Streptawell transparente de Alto Enlace, de Roche Diagnostics GmbH (número de catálogo 1 645 692, como se lista en Roche Molecular Biochemicals, Catálogo de Bioquímicos 2001). Las primeras plantillas continen un marcador de biotina 5' de forma que los productos de PCR se enlazan a los agujeros recubiertos de Estreptavidina, mientras que el

templete de ADN genómico no lo hace. La reacción de ligamiento de estreptavidina se realiza usando un Termomezclador (Eppendorf) a 1000 rpm por 20 min., a 37°C. Cada agujero es aspirado para remover el material no enlazado, y es lavado tres veces con PBS 1X, con cuidadoso mezclado (Kandpal et al., Nucl. Acid Res. 18:1789-1795 (1990)); Kaneoka et al., Biotechniques 10:30-34 (1991); Green et al., Nucleic Acids Res. 18:6163-6164 (1990)).

Alternativamente, los productos de PCR son colocados en un agujero simple de una placa de estreptavidina para llevar a cabo la reacción de incorporación del nucleótido en un agujero simple.

Digestión de la enzima de restricción de los fragmentos aislados

Los productos de PCR purificados son digeridos con la enzima de restricción BsmF I (New England Biolabs, número de catálogo R0572S), que se enlaza al sitio de reconocimiento incorporado en los productos de PCR de la segunda plantilla. Las digestiones son realizadas en los streptawells, siguiendo las instrucciones suministradas con la enzima de restricción. Después de la digestión con la enzima de restricción apropiada, los agujeros son lavados tres veces con PBS para remover los fragmentos clivados.

Incorporación del Nucleótido Marcado

La digestión de la enzima de restricción descrita anteriormente produjo un fragmento de ADN con una proyección 5' que contiene el sitio de interés, y un extremo 3' suspendido. La proyección 5' funciona como un templete que permite la incorporación de un nucleótido o nucleótidos en presencia de una polimerasa de ADN.

Para cada sitio de interés se realizan cuatro reacciones de llenado separadas; cada una de las cuatro reacciones contiene un ddNTP marcado fluorescentemente (ddATP, ddTTP, ddGTP o ddCTP). Se agregaron los siguientes componentes a cada reacción de llenado: 1 µl de ddNTP marcado fluorescentemente, 0.5 µl de ddNTPs no marcados (40 µM), que contienen todos los nucleótidos excepto el nucleótido que está marcado

fluorescentemente, 2 μ l de buffer de secuenasa 10X, 0.25 μ l de Secuenasa, y agua según se necesite para una reacción de 20 μ l. El llenado se realiza en reacciones a 40°C por 10 min. El ddNTP marcado no-fluorescentemente se compra en Fermentas Inc. (Hanover, MD). Todos los otros reactivos de marcado se obtienen en Amersham (Kit Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Core, US 79565). En presencia de los ddNTPs marcados fluorescentemente, el extremo 3' suspendido se extiende en una base, que corresponde al sitio de interés.

También se puede usar una mezcla de ddNTPs marcados y dNTPs no marcados para la reacción de llenado. Las condiciones de "llenado" se describieron anteriormente excepto que se usa una mezcla que contiene dNTPs no marcados 40 μ M, 1 μ l de ddATP marcado fluorescentemente, 1 μ l de ddTTP marcado fluorescentemente, 1 μ l de ddCPT, y 1 μ l de ddGTP. Los ddNTPs fluorescentes se obtienen de Amersham (Kit Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Core, US 79565; Amersham no publica las concentraciones de los nucleótidos fluorescentes). El sitio de interés es digerido con la enzima de restricción BsmF I, que genera una proyección 5' de cuatro bases. Si el primer nucleótido incorporado en un ddNTP marcado, el extremo 3' suspendido es llenado en una base, permitiendo la detección del sitio de interés. Sin embargo, si el primer nucleótido incorporado es un dNTP, la polimerasa continúa incorporando nucleótidos hasta que un ddNTP es llenado. Por ejemplo, los dos primeros nucleótidos se pueden llenar con dNTPs, y el tercer nucleótido con un ddNTP, que permite la detección del tercer nucleótido en la proyección. Así se determina la secuencia entera de la proyección 5', que aumenta la información obtenida de cada SNP o sitio de interés. Este tipo de reacción de llenado es especialmente útil para la detección de la presencia de inserciones, eliminaciones, inserciones y eliminaciones, redistribuciones y translocaciones.

Alternativamente, se usa un nucleótido marcado con un colorante simple para determinar la secuencia de un sitio de interés. Ver Ejemplo 6. Este método elimina cualquier error potencial al usar diferentes colorantes que tienen diferentes coeficientes cuánticos.

7/20

Después del marcado, cada streptawell es lavado con PBS 1X (100 μ l) tres veces. Los fragmentos de ADN "llenados" son luego liberados del streptawell mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI, según las instrucciones del fabricante que fueron suministradas con la enzima. La digestión se realiza por 1 hora a 37°C con agitación a 120 rpm.

Detección del Sitio de interés

Después de la liberación de la matriz de estreptavidina, la muestra fue cargada en una línea de un gel de acrilamida al 5% (urea) de 36 cm (Bio Whittaker Molecular Applications, Long Ranger Run Gel Packs, número de catálogo 50691). La muestra se somete a electroforesis en el gel a 3000 voltios por 3 min. El gel se corre por 3 horas en un aparato de secuenciamiento (Hoefer SQ3 Sequencer). El nucleótido marcado incorporado es detectado mediante fluorescencia.

Para determinar si cualquier célula contiene mutaciones en el codón 1370 del gen APC cuando se realizan las reacciones de llenado separadas, se analizan las líneas del gel que corresponden a la reacción de llenado para ddATP y ddTTP. Si solo están presentes células normales, la línea correspondiente a la reacción de llenado con ddATP es una señal brillante. No se detectó señal para la reacción de "llenado" con ddTTP. Sin embargo, si la muestra del paciente contiene células con mutaciones en el codón 1370 del gen APC, la línea correspondiente a la reacción de llenado con ddATP es una señal brillante, y se detecta una señal de la línea correspondiente a la reacción de llenado con ddTTP. La intensidad de la señal de la línea correspondiente a la reacción de llenado con ddTTP es indicativa de un número de células mutantes en la muestra.

Alternativamente, se usa un nucleótido marcado para determinar la secuencia de los alelos en el codón 1370 del gen APC. En el codón 1370, la secuencia normal es AAA, que codifica para lisina de amino ácido. Sin embargo, se ha identificado una sustitución de nucleótido en el codón 1370, que está asociado con tumores colorrectales. Específicamente se encuentra típicamente un cambio de A a T (AAA-TAA) en el codón 1370, que produce un codón de detención. La reacción de llenado simple se realiza usando

ddATP marcado, y dTTP, dCTP y dGTP no marcados. Se usa un nucleótido simple marcado con un colorante fluorescente para determinar la presencia de secuencia de ADN normal y mutante que se codifica en el codón 1370. La secuencia de ADN relevante está ilustrada a continuación, con la secuencia correspondiente al codón en negrita.

5' CCCAAAAGTCCACCTGA (SEC ID No: 46)
3' GGGTTTTTCAGGTGGACT (SEC ID No: 47)

Después de la digestion con BsmF I, se produce la siguiente proyección:

5' CCC				
3' GGG	T	T	T	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

Si la muestra del paciente no tiene células que albergan una mutación en el codón 1370, se ve una señal correspondiente a la incorporación de ddATP marcado.

5' CCC	A*			
3' GGG	T	T	T	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

Sin embargo, si la muestra del paciente tiene células con mutaciones en el codón 1370 del gen APC, se ve una señal que corresponde a la secuencia normal en el codón 1370, y se ve una segunda señal que corresponde a la secuencia mutante en el codón 1370. Las señales se identifican claramente porque son de diferente peso molecular.

Proyección de secuencia de ADN normal	CCC				
	GGG	T	T	T	T
Posición de la proyección		1	2	3	4
Secuencia de ADN normal después del llenado	CCC	A*			
	GGG	T	T	T	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Proyección de secuencia de ADN mutante	CCC				
	GGG	A	T	T	T
Posición de la proyección		1	2	3	4
Secuencia de ADN mutante después del llenado	CCC	T	A*		
	GGG	A	T	T	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Se ven dos señales cuando el alelo mutante está presente. Las moléculas de ADN mutante son llenadas en una base después de las moléculas de ADN tipo nativas. Las dos señales son separadas usando cualquier método que discrimina con base en el peso molecular. Se usa un nucleótido marcado (ddATP) para detectar la presencia de la secuencia de ADN tipo nativa y la secuencia de ADN mutante. Este método de marcado reduce el número de reacciones necesarias, y permite la cuantificación precisa del número de células mutantes en la muestra del paciente. El número de células mutantes en la muestra se usa para determinar el pronóstico del paciente, el grado y severidad de la enfermedad. Este método de marcado elimina las complicaciones asociadas al uso de colorantes diferentes que tienen coeficientes de cuánticos distintos. Este método de marcado también elimina los errores asociados con las reacciones de pipeteado.

Para determinar si una célula contiene mutaciones en el codón 1302 del gen APC cuando se realizan reacciones de llenado separadas, se analizan las líneas del gel que corresponden a las reacciones de llenado para ddTTP y ddCTP. La secuencia de ADN normal está descrita a continuación, con la secuencia correspondiente al codón en negrita.

Secuencia Normal 5' ACCCCTGCAAATAGCAGAA (SEC ID No: 48)
3' TGGGACGTTTATCGTCTT (SEC ID No: 49)

Después de la digestión, se produce la siguiente proyección 5':

5' ACCC				
3' TGGG	A	C	G	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

Después de la reacción de llenado, el ddTTP marcado es incorporado

5' ACCC	T*			
3' TGGG	A	C	G	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

Una eliminación de una base simple de la secuencia de APC, que típicamente codifica en el codón 1302, se ha asociado con tumores colorrectales. La secuencia de ADN mutante está descrita a continuación con la secuencia relevante en negrita:

Secuencia Mutante 5' ACCCGCAAATAGCAGAA (SEC ID No: 50)
3' TGGGCGTTTATCGTCTT (SEC ID No: 51)

Después de la digestión:

5' ACC				
3' TGG	G	C	G	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

Después del llenado

5' ACC	C*			
3' TGG	G	C	G	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

Si no hay mutaciones en el gen APC, no se detecta señal para la reacción de llenado con ddCTP*, pero se detecta una señal brillante para la reacción de llenado con ddTTP*. Sin embargo, si hay células en la muestra del paciente que tienen mutaciones en el gen APC, se ven señales para las reacciones de llenado con ddCTP* y ddTTP*.

Alternativamente, se realiza una reacción de llenado simple usando una mezcla que contiene dNTPs no marcados, ddATP marcado fluorescentemente, ddTTP marcado fluorescentemente, ddCTP marcado

fluorescentemente y ddGTP marcado fluorescentemente. Si no hay eliminación, el ddTTP marcado es incorporado.

5' ACCC	T*			
3' TGGG	A	C	G	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

Sin embargo, si la T ha sido eliminada, el ddCTP* marcado es incorporado.

5' ACCC*				
3' TGGG	C	G	T	
Posición de la proyección	1	2	3	4

Las dos señales son separadas por peso molecular por la eliminación del nucleótido de timidina. Si las células mutantes están presentes, las dos señales son generadas en la misma línea pero son separadas por un par base simple (este principio está demostrado en la FIG. 9D). La eliminación causa un cambio en el peso molecular de los fragmentos de ADN, que permite usar una reacción de llenado simple para detectar la presencia de células normales y mutantes.

En el ejemplo anterior se describen los métodos para la detección de una sustitución de nucleótido y una pequeña eliminación. Sin embargo, los métodos se pueden usar para la detección de cualquier tipo de mutación que incluye, sin limitarse a sustituciones de nucleótido (ver Tabla VII), errores de empalme (ver tabla VIII), pequeñas eliminaciones (ver tabla IX), inserciones pequeñas (ver tabla X), pequeñas inserciones/eliminaciones (Ver Tabla XI), eliminaciones gruesas (ver Tabla XIII), inserciones gruesas (ver Tabla XIII) y redistribuciones complejas (ver Tabla XIV).

Además, los métodos descritos anteriormente se usan para la detección de cualquier tipo de enfermedad incluyendo, pero sin limitarse a las listadas en la Tabla IV. Además, usando las invenciones descritas aquí se detecta cualquier tipo de gen mutante incluyendo, pero sin limitarse a genes asociados con las enfermedades listadas en la Tabla IV, BRCA1, BRCA2, MSH6, MSH2, MLH1, RET, PTEN, ATM, H-RAS, p53, ELAC2,

CDH1, APC, AR, PMS2, MLH3, CYP1A1, GSTP1, GSTM1, AXIN2, CYP19, MET, NAT1, CDKN2A, NQO1, *trc8*, RAD51, PMS1, TGFBR2, VHL, MC4R, POMC, NROB2, UCP2, PCSK1, PPARG, ADRB2, UCP3, *glur1*, *cart*, SORBS1, LEP, LEPR, SIM1, TNF, IL-6, IL-1, IL-2, IL-3, IL1A, TAP2, THPO, THRB, NBS1, RBM15, LIF, MPL, RUNX1, Her-2, receptor glucocorticoid, receptor estrógeno, receptor tiroidea, p21, p27, K-RAS, N-RAS, proteína retinoblastoma, gen Wiskott-Aldrich (WAS), Factor V Leiden, Factor II (protrombina), reductasa metilen tetrahidrofolato, fibrosis quística, receptor LDL, receptor HDL, gen dismutasa superóxido, gen SHOX, genes involucrados en la regulación de óxido nítrico, genes involucrados en la regulación del ciclo de célula, genes supresores de tumor, oncogénicos, genes asociados con neurodegeneración, genes asociados con obesidad. Las abreviaturas corresponden a las proteínas como se listan en la Base de Datos de Mutación de Gen Humano, que está incorporado a este como referencia, www.archive.uwcm.ac.uk/uwcm; página web activa desde Febrero 12 de 2003).

Los ejemplos anteriores muestran la detección de células mutantes y alelos mutantes de una muestra fecal. Sin embargo, los métodos descritos aquí se usan para la detección de células mutantes de cualquier muestra biológica que incluye, sin limitarse a muestra de sangre, muestra de suero, muestra de plasma, muestra de orina, fluido espinal, fluido linfático, semen, secreción vaginal, fluido ascítico, saliva, secreción mucosa, fluido peritoneal, muestra fecal, transpiraciones corporales, fluido del pecho, aspiraciones pulmonares, células, tejidos, células individuales o extractos de dichas fuentes que contienen el ácido nucleico de las mismas, y estructuras sub-celulares tales como mitocondria o cloroplastos. Además, los métodos descritos aquí se usan para la detección de células mutantes y ADN mutante de cualquier número de ácidos nucleicos que contienen fuentes que incluyen, pero no se limitan a muestras forenses, de alimento, arqueológicas, agrícolas o inorgánicas.

El ejemplo anterior está dirigido a la detección de mutaciones en el gen APC. Sin embargo, las invenciones descritas aquí se usan para la detección de mutaciones en cualquier gen que está asociado, o que predispone una enfermedad (ver Tabla XV).

Por ejemplo, la hipermetilación del promotor de glutathione S-transferasa (GSTP1) es la alteración de ADN más común en el cáncer de próstata. El estado de mutación del promotor se determina usando bisulfito de sodio y los métodos descritos aquí.

El tratamiento con bisulfito de sodio convierte los residuos de citosina no metilados en uracilo, y deja las citosinas metiladas sin cambiar. Usando los métodos descritos aquí, se diseñan una primera y segunda plantilla para amplificar las regiones del promotor de GSTP1 que usualmente están metiladas. A continuación se muestra una región del promotor GSTP1 antes del tratamiento con bisulfito de sodio:

Antes del tratamiento con bisulfito de sodio:

5' ACCGCTACA
3' TGGCGATCA

A continuación se muestra una región del promotor GSTP1 después del tratamiento con bisulfito de sodio, amplificación de PCR, y la digestión con la enzima de restricción tipo IIS BsmF I:

No metilado				
	5' ACC			
	3' TGG	U	G	A T
Posición de la proyección		1	2	3 4
Metilado				
	5' ACC			
	3' TGG	C	G	A T
Posición de la proyección		1	2	3 4

Se usa ddATP marcado, dCTP, dGTP y dTTP no marcados para llenar las proyecciones 5'. Se generan las siguientes moléculas:

No metilado				
	5' ACC	A*		
	3' TGG	U	G	A T
Posición de la proyección		1	2	3 4

182

Metilado

5' ACC	G	C	T	A*
3' TGG	C	G	A	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

Se ven dos señales; una corresponde a las moléculas de ADN llenadas con ddATP en la posición complementaria a la proyección (no metilada), y la otra corresponde a las moléculas de ADN llenadas con ddATP en la posición 4 complementaria a la proyección (metilada). Las dos señales son separadas con base en el peso molecular. Alternativamente, las reacciones de llenado se llevan a cabo en reacciones separadas usando ddGTP marcado en una reacción y ddATP marcado en otra reacción.

Los métodos descritos aquí se usan para detectar cáncer de próstata y también para monitorear la progresión y severidad de la enfermedad. El uso de un nucleótido simple para detectar las secuencias metiladas y no metiladas permite la cuantificación precisa, y provee un nivel alto de sensibilidad para las secuencias metiladas, que es una herramienta útil para la detección temprana de una enfermedad.

La información contenida en las Tablas VII-XIV se obtuvo de la Base de Datos de Mutación del Gen Humano. Con la información suministrada aquí, el experto entenderá cómo aplicar estos métodos para la determinación de la secuencia de los alelos en cualquier gen. Se puede encontrar un gran número de genes y las mutaciones asociadas en la siguiente pagina de Internet: www.archive.uwcm.ac.uk./uwcm.

TABLA VII: SUSTITUCIONES DE NUCLEOTIDO

Codón	Nucleótido	Aminoácido	Fenotipo
99	CGG-TGG	Arg-Trp	Poliposis Cólica Adenomatosa
121	AGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
157	TGG-TAG	Trp-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
159	TAC-TAG	Tyr-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
163	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa

168	AGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
171	AGT-ATT	Ser-Ile	Poliposis Cólica Adenomatosa
181	CAA-TAA	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
190	GAA-TAA	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
202	GAA-TAA	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
208	CAG-CGG	Gln-Arg	Poliposis Cólica Adenomatosa
208	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
213	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
215	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
216	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
232	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
233	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
247	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
267	GGA-TGA	Gly-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
278	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
280	TCA-TGA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
280	TCA-TAA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
283	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
302	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
332	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
358	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
405	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
414	CGC-TGC	Arg-Cys	Poliposis Cólica Adenomatosa
422	GAG-TAG	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
423	TGG-TAG	Trp-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
424	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
433	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
443	GAA-TAA	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
457	TCA-TAA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
473	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
486	TAC-TAG	Tyr-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
499	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
500	TAT-TAG	Tyr-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
541	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
553	TGG-TAG	Trp-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa

554	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
564	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
577	TTA-TAA	Leu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
586	AAA-TAA	Lys-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
592	TTA-TGA	Leu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
593	TGG-TAG	Trp-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
593	TGG-TGA	Trp-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
622	TAC-TAA	Tyr-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
625	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
629	TTA-TAA	Leu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
650	CAG-TAG	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
684	TTG-TAG	Leu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
685	TTG-TGA	Trp-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
695	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
699	TGG-TGA	Trp-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
699	TGG-TAG	Trp-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
713	TCA-TGA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
722	AGT-GGT	Ser-Gly	Poliposis Cólica Adenomatosa
747	TCA-TGA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
764	TTA-TAA	Leu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
784	TCT-ACT	Ser-Thr	Poliposis Cólica Adenomatosa
805	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
811	TCA-TGA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
848	AAA-TAA	Lys-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
876	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
879	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
893	GAA-TAA	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
932	TCA-TAA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
932	TCA-TGA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
935	TAC-TAG	Tyr-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
935	TAC-TAA	Tyr-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
995	TGC-TGA	Cys-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
997	TAT-TAG	Tyr-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
999	CAA-TAA	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1000	TAC-TAA	Tyr-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa

1020	GAA-TAA	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1032	TCA-TAA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1041	CAA-TAA	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1044	TCA-TAA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1045	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1049	TGG-TGA	Trp-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1067	CAA-TAA	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1071	CAA-TAA	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1075	TAT-TAA	Tyr-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1075	TAT-TAG	Tyr-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1102	TAC-TAG	Tyr-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1110	TCA-TGA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1114	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1123	CAA-TAA	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1135	TAT-TAG	Tyr-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1152	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1155	GAA-TAA	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1168	GAA-TAA	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1175	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1176	CCT-CTT	Pro-Leu	Poliposis Cólica Adenomatosa
1184	GCC-CCC	Ala-Pro	Poliposis Cólica Adenomatosa
1193	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1194	TCA-TGA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1198	TCA-TGA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1201	TCA-TGA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1228	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1230	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1244	CAA-TAA	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1249	TGC-TGA	Cys-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1256	CAA-TAA	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1262	TAT-TAA	Tyr-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1270	TGT-TGA	Cys-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1276	TCA-TGA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1278	TCA-TAA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1286	GAA-TAA	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa

1289	TGT-TGA	Cys-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1294	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1307	ATA-AAA	Ile-Lys	Cancer colorrectal, predisposición a, asociación
1309	GAA-TAA	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1317	GAA-CAA	Glu-Gln	Poliposis Cólica Adenomatosa
1328	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1338	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1342	TTA-TAA	Leu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1342	TTA-TGA	Leu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1348	AGG-TGG	Arg-Trp	Poliposis Cólica Adenomatosa
1357	GGA-TGA	Gly-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1367	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1370	AAA-TAA	Lys-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1392	TCA-AAA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1392	TCA-TGA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1397	GAG-TAG	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1449	AAG-TAG	Lys-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1450	CGA-TGA	Arg-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1451	GAA-TAA	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1503	TCA-TAA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1517	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1529	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1539	TAC-TAA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1541	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1564	TTA-TAA	Leu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1567	TCA-TGA	Ser-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1640	GGG-TGG	Arg-Trp	Poliposis Cólica Adenomatosa
1693	GAA-TAA	Glu-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
1822	GAC-GTC	As-Val	Poliposis cólica adenomatosa, asociación con?
2038	CTG-GTG	Leu-val	Poliposis Cólica Adenomatosa
2040	CAG-TAG	Gln-Term	Poliposis Cólica Adenomatosa
2566	AGA-AAA	Arg-Lys	Poliposis Cólica Adenomatosa
2621	TCT-TGT	Ser-Cys	Poliposis Cólica Adenomatosa
2839	CTT-TTT	Leu-Phe	Poliposis Cólica Adenomatosa

TABLA VII: SUSTITUCIONES DE NUCLEOTIDOS

Donante/ aceptor	Ubicación relativa	Sustitución	Fenotipo
ds	-1	G-C	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-1	G-A	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-1	G-C	Poliposis Cólica Adenomatosa
ds	+2	T-A	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-1	G-C	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-1	G-T	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-1	G-A	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-2	A-C	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-5	A-G	Poliposis Cólica Adenomatosa
ds	+3	A-C	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-1	G-A	Poliposis Cólica Adenomatosa
ds	+1	G-A	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-1	G-T	Poliposis Cólica Adenomatosa
ds	+1	G-A	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-1	G-A	Poliposis Cólica Adenomatosa
ds	+1	G-A	Poliposis Cólica Adenomatosa
ds	+3	A-G	Poliposis Cólica Adenomatosa
ds	+5	G-T	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-1	G-A	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-6	A-G	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-5	A-G	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-2	A-G	Poliposis Cólica Adenomatosa
ds	+2	T-C	Poliposis Cólica Adenomatosa
as	-2	A-G	Poliposis Cólica Adenomatosa
ds	+1	G-A	Poliposis Cólica Adenomatosa
ds	+1	G-T	Poliposis Cólica Adenomatosa
ds	+2	T-G	Poliposis Cólica Adenomatosa

TABLA IX: ELIMINACIONES PEQUEÑAS DE APC

Las letras en negrita indican el codón. Las letras en minúsculas representan la eliminación. Cuando las eliminaciones se extienden más allá de la región de codificación, se provee otra información adicional. Por ejemplo, la abreviatura 5' UTR representa región no trasladada 5', y la abreviación E616 denota el límite exón 6 / intrón 6.

Ubicación/Codón	Eliminación	Fenotipo	
77	T A gataGCAGTAATTT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 52
97	GGAAGccggggaggGATCTGTATC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 53
138	GAGAAAGAGAG_E3I3_GTAA	Cáncer de Tiroides	SEC ID No: 54
139	AAAGAgag_E3I3_Gtaacttttct	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 55
139	AAAGagag_E3I3_GTAACTTTTC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 56
142	TTTTAAAAAAaAAAAATAG_I3E4_GTCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 57
144	AAAATAG_I3E4_GTCaTGCTTCTTGC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 58
149	GACAaaGAAGAAAAGG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 59
149	GACAAagaaGAAAAGGAAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 60
155	AGGAA^AAAGActggtATTACGCTCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 61
169	AAAAGA^ATAGatagTCTTCCTTTA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 62
172	AGATAGT^CTTcCTTTAACTGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 63
179	TCCTT a caaACAGATATGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 64
185	ACC a GAAGGCAATT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 65
198	ATCAGagTTGCGATGGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 66
213	CGAGCaCAG_E5I5_GTAAGTT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 67
298	CAC t cTGACCTCGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 68
329	GAT a TGTCGCGAAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 69
385	AAAGActCTGTATTGTT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 70
397	GACaaGAGAGGCAGG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 71
427	CATGA a cCAGGCATGGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 72
428	GAACCaGGCATGGACC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 73

436	ATTCCaa_E9I9_gTATGTTCTCT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 74
440	GTCCCI GTTGAACATC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 75
455	AAACTtTCATTTGATG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 76
455	AAACTttcaTTTGATGAAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 77
472	CTAcAGGCCATTGC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 78
472	TAAATTAG_I10E11_GGgGACTACAGGC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 79
478	TTATtGCAAGTGGAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 80
486	TACGgGCTTACTAAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 81
494	AGTATtACACTAAGAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 82
495	ATTACacTAAGACGATA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 83
497	CTAaGACGATATGC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 84
520	TGCTCaTGAAAGGCTG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 85
526	ATGAGagcacttgGCCCCAACTAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 86
539	GACTTaCAGCAG_E12I12_GTAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 87
560	AAAAAgaCGTTGCGAGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 88
566	GTTGgaagtGTGAAAGCAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 89
570	AAAGCaTTGATGGAAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 90
577	TTAGaagtTAAAAAG_E13I13_GTA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 91
584	ACCCTcAAAAGCGTAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 92
591	GCCTtATGGAATTTG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 93
608	GCTgTAGATGGTGC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 94
617	GTTggcactcttacttaccGGAGCCAGAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 95
620	CTTACttacCGGAGCCAGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 96
621	ACTTaCCGGAGCCAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 97
624	AGCcaGACAAACACT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 98
624	AGCCagacAAACACTTTA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 99
626	ACAaacaCTTTAGCCAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 100
629	TTAGCcATTATTGAAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 101
635	GGAGgTGGGATATTA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 102
638	ATATtACGGAATGTG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 103
639	TTACGgAATGTGTCCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 104
657	AGAGaGAACAACGT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 105

659	TATTTcAG_I14E15_GCaaatcctaagagagA ACAACtGTC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 106
660	AACTgtCTACAAACTT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 107
665	TTAtACAACACTTA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 108
668	CACtAAAAATCTCAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 109
673	AGTttgacaatagtCAGTAATGCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 110
768	CACTTaTCAGAAACTT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 111
769	TTATcAGAAACTTTT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 112
770	TCAGAAACTTTTGACA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 113
780	AGTCcCAAGGCATCT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 114
792	AAGCaAAGTCTCTAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 115
792	AAGCAaaGTCTCTATGG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 116
793	CAAAGtCTCTATGGT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 117
798	GATTatGTTTTTGACA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 118
802	GACACcaatcgacatGATGATAATA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 119
805	CGACatGATGATAATA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 120
811	TCAGacaaTTTTAATACT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 121
825	TATtTGAATACTAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 122
827	AATAcTACAGTGTTA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 123
830	GTGTTaccagctcctctTCATCAAGAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 124
833	AGCTCcTCTTCATCAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 125
836	TCATcAAGAGGAAGC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 126
848	AAAGAtaGAAGTTTGGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 127
848	AAAGatagaagTTTGGAGAGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 128
855	GAACgCGGAATTGGT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 129
856	CGCGgaattGGTCTAGGCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 130
856	CGCGgAATTGGTCTA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 131
879	CAGaTCTCCACCAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 132
902	GAAGAcagaAGTTCTGGGT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 133
907	GGGTcTACCACTGAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 134
915	GTGACaGATGAGAGAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 135
929	GATACacatCAAACACTT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 136

930	ACACAttcaAACACTTACA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 137
931	CATtCAAACACTTA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 138
931	CATTcAAACACTTAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 139
933	AACacttACAATTTAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 140
935	TACAatttcactAAGTCGGAAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 141
937	TTCActaaGTCGGAAAAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 142
939	AAGtcggAAAATTCAAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 143
946	ACATgTTCTATGCCT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 144
954	TTAGaaTACAAGAGAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 145
961	AATgATAGTTTAAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 146
963	AGTTTtAATAGTGTCa	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 147
964	TTAaataGTGTCAGTAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 148
973	TATGgTAAAGAGGT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 149
974	GGTAAaAGAGGTCAAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 150
975	AAAagaGGTCAAATGA	Cáncer de Tiroides	SEC ID No: 151
992	AGTAAgTTTTGCAGTT	Cáncer de Tiroides	SEC ID No: 152
993	AAGttttgcagtttTGGTCAATAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 153
999	CAAtaccagCCGACCTAGC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 154
1023	ACACcAATAAATTAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 155
1030	AAAATTTCAGATGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 156
1032	TCAGatgagCAGTTGAACT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 157
1033	GATGaGCAGTTGAAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 158
1049	TGGGcAAGACCCAAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 159
1054	CACAtaataGAAGATGAAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 160
1055	ATAAtagaaGATGAAATAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 161
1056	ATAGaaGATGAAATAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 162
1060	ATAAAacaaaGTGAGCAAAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 163
1061	AAAcaaaGTGAGCAAAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 164
1061	AAACaaAGTGAGCAAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 165
1062	CAAAgtgaGCAAAGACAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 166
1065	CAAAGacAATCAAGGAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 167

1067	CAA ~~t~~ caaGGAATCAAAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 168
1071	CAA ~~A~~ gtACAACTTATC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 169
1079	ACTG ~~a~~ gAGCACTGATG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 170
1082	ATCGA ~~t~~ gATAAACACCT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 171
1084	GAT ~~a~~ aacACCTCAAGTT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 172
1086	CAC ~~C~~ t ~~c~~ AAGTTCCAAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 173
1093	TTTG ~~g~~ ACAGCAGGAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 174
1098	TGT ~~g~~ tTTCTCCATAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 175
1105	CGG ~~g~~ GAGCCAATGG	Cáncer de Tiroides	SEC ID No: 176
1110	TCAGA ~~a~~ ACAAATCGAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 177
1121	ATTA ~~A~~ tcaaAATGTAAGCC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 178
1131	CA ~~A~~ gAAGATGACTA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 179
1134	GACTA ~~I~~ GAAAGATGATA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 180
1137	GAT ~~g~~ ataaGCCTACCAAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 181
1146	CGTTA ~~c~~ TCTGAAGAAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 182
1154	GAAGa ~~a~~ gaaGAGAGACCAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 183
1155	GAAGa ~~a~~ gaGAGACCAACA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 184
1156	GA ~~A~~ gagaGACCAACAAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 185
1168	GA ~~A~~ gagaaACGTCATGTG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 186
1178	GATT ~~A~~ tagtttaAAATATGCCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 187
1181	TTAA ~~a~~ ATATGCCACA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 188
1184	GCCa ~~c~~ agaTATTCCTTCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 189
1185	ACA ~~g~~ aTATTCCTTCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 190
1190	TCAC ~~A~~ gAAACAGTCAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 191
1192	AA ~~A~~ caGTCATTTTCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 192
1198	TCA ~~a~~ aGAGTTCATCT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 193
1207	AAA ~~A~~ cCGAACATATG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 194
1208	ACC ~~g~~ aacATATGTCTTC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 195
1210	CAT ~~a~~ tGTCTTCAAGC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 196
1233	CCAAG ~~I~~ TCTGCACAGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 197
1249	TGCA ~~a~~ aGTTTCTTCTA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 198
1259	ATA ~~c~~ aGACTTATTGT	Poliposis Cólica	SEC ID No: 199

		Adenomatosa	
1260	CAGACtATTGTGTAGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 200
1268	CCAaTATGTTTTTC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 201
1275	AGTtCATTATCATC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 202
1294	CAGGAaGCAGATTCTG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 203
1301	ACCCtGCAAATAGCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 204
1306	GAAAtaaaAGAAAAGATT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 205
1307	ATAaAAGAAAAGAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 206
1308	AAAGaaaAGATTGGAAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 207
1308	AAAGAaaagaTTGGAAGTAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 208
1318	GATCcTGTGAGCGAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 209
1320	GTGAGcGAAGTTCCAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 210
1323	GTTCcAGCAGTGTCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 211
1329	CACCctagaaccAAATCCAGCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 212
1336	AGACtgCAGGGTTCTA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 213
1338	CAGgGTTCTAGTTT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 214
1340	TCTAgTTTATCTTCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 215
1342	TTATcTTCAGAATCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 216
1352	GTTgAATTTTCTTC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 217
1361	CCCTcAAAAGTGGT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 218
1364	ATGggtgCTCAGACACC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 219
1371	AGTCCacCTGAACACTA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 220
1372	CCACCI GAACACTATG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 221
1376	TATGttCAGGAGACCC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 222
1394	GATAgfTTTGAGAGTC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 223
1401	ATTGCcAGCTCCGTTC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 224
1415	AGTGGcATTATAAGCC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 225
1426	AGCCcTGGACAAACC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 226
1427	CCTGGaCAAACCATGC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 227
1431	ATGCCACCAAGCAGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 228
1454	AAAAAIAAGCACCTA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 229
1461	GAAaAGAGAGAGAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 230
1463	AGAgagaGTGGACCTAA	Poliposis Cólica	SEC ID No: 231

		Adenomatosa	
1484	GAGAgTGGACCTAAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 232
1484	GAGAgTGGACCTAAGC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 233
1484	GAGAgTGGACCTAAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 234
1492	GCCaCGGAAAGTAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 235
1493	ACGGAAAGTACTCCAG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 236
1497	CCAGaTGGATTTTC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 237
1503	TCAIccaGCCTGAGTGC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 238
1522	TTAagaataaTGCTCCAGT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 239
1536	GAAACagAATCAGAGCA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 240
1545	TCAAAtgaaaACCAAGAGAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 241
1547	GAAaACCAAGAGAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 242
1550	GAGAaagaGGCAGAAAAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 243
1577	GAATgtATTATTTCTG	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 244
1594	CCAGCcCAGACTGCTT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 245
1596	CAGACIGCTTCAAAT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 246
1823	TTCAaTGATAAGCTC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 247
1859	AATGAItctTTGAGTTCTC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 248
1941	CCAGAcagaGGGGCAGCAA	Tumores Desmoides	SEC ID No: 249
1957	GAAaATACTCCAGT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 250
1980	AACaATAAAGAAAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 251
1985	GAACCIATCAAAGAGA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 252
1986	CCTaTCAAAGAGAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 253
1998	GAACcAAGTAAACCT	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 254
2044	AGCTCcGCAATGCCAA	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 255
2556	TCATCccttcctcGAGTAAGCAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 256
2643	CTAATItatCAAATGGCAC	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 257

TABLA X: INSERSIONES PEQUEÑAS

28

Codón	Inserción	Fenotipo
157	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
170	AGAT	Poliposis Cólica Adenomatosa
172	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
199	G	Poliposis Cólica Adenomatosa
243	AG	Poliposis Cólica Adenomatosa
266	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
357	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
405	C	Poliposis Cólica Adenomatosa
413	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
416	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
457	G	Poliposis Cólica Adenomatosa
473	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
503	ATTC	Poliposis Cólica Adenomatosa
519	C	Poliposis Cólica Adenomatosa
528	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
561	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
608	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
620	CT	Poliposis Cólica Adenomatosa
621	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
623	TTAC	Poliposis Cólica Adenomatosa
627	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
629	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
636	GT	Poliposis Cólica Adenomatosa
639	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
704	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
740	ATGC	Poliposis Cólica Adenomatosa
764	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
779	TT	Poliposis Cólica Adenomatosa
807	AT	Poliposis Cólica Adenomatosa
827	AT	Poliposis Cólica Adenomatosa
831	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
841	CTTA	Poliposis Cólica Adenomatosa
865	CT	Poliposis Cólica Adenomatosa
865	AT	Poliposis Cólica Adenomatosa

900	TG	Poliposis Cólica Adenomatosa
921	G	Poliposis Cólica Adenomatosa
927	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
935	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
936	C	Poliposis Cólica Adenomatosa
975	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
985	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
997	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
1010	TA	Poliposis Cólica Adenomatosa
1085	C	Poliposis Cólica Adenomatosa
1085	AT	Poliposis Cólica Adenomatosa
1095	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
1100	GTTT	Poliposis Cólica Adenomatosa
1107	GGAG	Poliposis Cólica Adenomatosa
1120	G	Poliposis Cólica Adenomatosa
1166	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
1179	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
1187	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
1211	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
1256	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
1265	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
1267	GATA	Poliposis Cólica Adenomatosa
1268	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
1301	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
1301	C	Poliposis Cólica Adenomatosa
1323	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
1342	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
1382	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
1458	GTAG	Poliposis Cólica Adenomatosa
1463	AG	Poliposis Cólica Adenomatosa
1488	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
1531	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
1533	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
1554	A	Poliposis Cólica Adenomatosa
1555	A	Poliposis Cólica Adenomatosa

1556	T	Poliposis Cólica Adenomatosa
1563	GACCT	Poliposis Cólica Adenomatosa
1924	AA	Tumores Desmoides

TABLA XI: INSERCIONES/ELIMINACIONES PEQUEÑAS

Ubicación/ Codón	Eliminación	Insertión	Fenotipo	
538	GAAGAcTTACAGCAGG	Gaa	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 258
620	CTTACttaCCGGAGCCAG	Ct	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 259
728	AATctcatGGCAAATAGG (SEC ID No: 260)	Ttgcagctttaa (SEC ID No: 261)	Poliposis Cólica Adenomatosa	
971	GATGgtTATGGTAAAA	taa	Poliposis Cólica Adenomatosa	SEC ID No: 262

TABLA XII: ELIMINACIONES GRUESAS

2 kb incluyendo ex. 11	Poliposis Cólica Adenomatosa
3 kb l10E11-1.5 kb a l12E13-170 bp	Poliposis Cólica Adenomatosa
335 bp nt. 1409-1473 ex. 11-13	Poliposis Cólica Adenomatosa
6 kb incl. ex. 14	Poliposis Cólica Adenomatosa
817 bp l13E14-679 a l13E14+138	Poliposis Cólica Adenomatosa
ex. 11-15M	Poliposis Cólica Adenomatosa
ex. 11-3'UTR	Poliposis Cólica Adenomatosa
ex. 15A- ex. 15F	Poliposis Cólica Adenomatosa
ex. 4	Poliposis Cólica Adenomatosa
ex. 7, 8, y 9	Poliposis Cólica Adenomatosa
ex. 8 hasta más allá de ex. 15F	Poliposis Cólica Adenomatosa
ex. 8 – ex. 15F	Poliposis Cólica Adenomatosa
ex. 9	Poliposis Cólica Adenomatosa
>10 mb (elim. 5q22)	Poliposis Cólica Adenomatosa

TABLA XIII: INSERCIONES Y DUPLICACIONES GRUESAS

Descripción	Fenotipo
Inserción de 14 bp nt. 3816	Poliposis Cólica Adenomatosa
Inserción de 22 bp nt. 4022	Poliposis Cólica Adenomatosa
Duplicación de 43 bp cd. 1295	Poliposis Cólica Adenomatosa
Inserción de 337 bp de secuencia de Alu I cd. 1526	Tumores Desmoides

TABLA XIV: REDISTRIBUCIONES COMPLEJAS (INCLUYENDO INVERSIONES)

A-T nt. 4893 Q1625H, Elim. C nt. 4897 cd. 1627	Poliposis Cólica Adenomatosa
Elim. 1099 bp I13E14-728 a E14I14+156, ins. 126 bp	Poliposis Cólica Adenomatosa
Elim. 1061 bp E14I14+27 a E14I14+1627, ins. 180 bp	Poliposis Cólica Adenomatosa
Elim. 130 bp, ins. 15 bp nt. 4394, cd 1464	Poliposis Cólica Adenomatosa
Elim. A y T cd. 1395	Poliposis Cólica Adenomatosa
Elim. TC nt. 4145, Elim. TGT nt. 4148	Poliposis Cólica Adenomatosa
Elim. T, nt. 983, Elim. 70 bp, nt. 985	Poliposis Cólica Adenomatosa
Elim. Nt. 3892-3903, ins ATTT	Poliposis Cólica Adenomatosa

TABLA XV: APLICACIONES DE DIAGNOSTICO

Tipo de Cáncer	Marcador	Aplicación	Referencia
Seno	Her2/Neu Detección- polimorfismo en el codón 665 (GTC/valina a ATC/Isoleucina [Val(665)Ile]	Usando los métodos descritos aquí, el diseño de la segunda plantilla de forma que después de la PCR y la digestión con la enzima de restricción, se genere una proyección 5' que contiene secuencia de ADN para el codón 665 de Her2/Neu. Her2/Neu se puede detectar y cuantificar como marcador posible del cáncer de seno. Los métodos descritos aquí detectan ambos, alelo mutante y alelo normal, incluso cuando el alelo mutante está en una pequeña fracción del ADN total.	D. Xie <i>et al.</i> , <i>J. Natl. Cancer Institute</i> , 92, 412 (2000) K.S. Wilson <i>et al.</i> , <i>Am. J. Pathol.</i> , 161, 11 71 (2002) L. Neuman, <i>Cancer Control</i> , 9, 473 (2002)

		La terapia de Herceptina para el cancer de seno se basa en la detección de Her2. Entre más tempranamente se puede detectar el alelo mutante, más rápido se puede suministrar terapia.	
Seno/Ovario	Hipermetilación de BRCA1	Los métodos descritos aquí se pueden usar para diferenciar entre tumores producidos por mutaciones BRCA1 hereditarias y aquellos de metilación anormal no hereditaria del gen.	M. Esteller <i>et al.</i> , <i>New England Jnl Med.</i> , 344, 539 (2001)
Vejiga	Análisis microsatelital de ADN libre de tumor en la Orina, Suero y Plasma	Los métodos descritos aquí se pueden aplicar en el análisis microsatelital para la detección de cáncer de vejiga. Los métodos descritos aquí se proveen un método no invasivo para la detección de cáncer de vejiga.	W.G. Bas <i>et al.</i> , <i>Clinical Cancer Res.</i> , 9, 257 (2003) M. Utting <i>et al.</i> , <i>Clinical Cancer Res.</i> , 8, 35 (2002) L. Mao, D.Sidransky <i>et al.</i> , <i>Scienca</i> , 271, 669 (1996)
Pulmón	Análisis microsatelital de ADN de esputo	Los métodos descritos aquí se pueden usar para detectar mutaciones en las muestras de esputo, y pueden elevar marcadamente la precisión de la detección de cáncer de pulmón preclínica.	T.Liloglou <i>et al.</i> , <i>Cancer Research</i> , 61, 1624, (2001) M. Tockman <i>et al.</i> , <i>Cancer Control</i> , 7, 19 (2000) Field <i>et al.</i> , <i>Cancer Research</i> , 59, 2690 (1999)
Cervical	Análisis del genotipo HPV	Los métodos descritos aquí se pueden usar para detectar el genotipo HPV de una preparación de frotis cervical.	N. Munoz <i>et al.</i> , <i>New England Jnl Med.</i> , 348, 518 (2003)
Cabeza y	Alteraciones	Los métodos descritos aquí se	M. Spafford <i>et al.</i>

Cuello	específicas tumorales en las células orales exfoliadas (marcadores microsatelitales)	pueden usar para detectar cualquiera de los 23 marcadores microsatelitales que están asociados con el Carcinoma de Célula Escamosa de Cabeza y Cuello (HNSCC)	<i>Clinical Cancer Research</i> , 17, 607 (2001) A. El-Naggar <i>et al.</i> , <i>J. Mol. Diag.</i> , 3, 164 (2001)
Colorrectal	Detección de mutación en los genes K-ras2 y APC	Los métodos descritos aquí se pueden usar para detectar mutaciones K-ras 2 que se pueden usar como un indicador de pronóstico de cáncer colorrectal APC (Ver Ejemplo 5)	B. Ryan <i>et al.</i> , <i>Gut</i> , 52, 101 (2003)
Próstata	Hipermetilación de GSTP1	Los métodos descritos aquí se pueden usar para detectar la hipermetilación de GSTP1 en la orina de pacientes con cáncer de próstata; este puede ser un indicador más preciso que el PSA.	P. Cairns <i>et al.</i> , <i>Clin. Can. Res.</i> , 7, 2727 (2001)

VIH

Resistencia Antiretroviral	Detección de individuos con mutaciones en el virus del VIH – e.g., mutación 154 V o alelo CCR5 Δ 32	Los métodos descritos aquí se pueden usar la detección de mutaciones en el virus del VIH. Los resultados del tratamiento son mejores en individuos que reciben terapia anti-retroviral con base en la detección de resistencia.	J. Duran <i>et al.</i> , <i>The Lancet</i> , 353, 2195 (1999)
----------------------------	---	---	---

Cardiología

Falla cardíaca congestiva	Polimorfismos sinérgicos de los receptores adrenérgicos beta1 y alfa2c	Los métodos descritos aquí se pueden usar para genotipar estos sitios de interés y pueden ayudar a indentificar la gente que está en más alto riesgo de falla cardíaca.	K. Small <i>et al.</i> , <i>New England, Jnl Med.</i> , 347, 1135 (2002)
---------------------------	--	---	--

EJEMPLO 8

Los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) representan la forma más común de variación de secuencia; se ha estimado que tres millones de SNPs comunes con una frecuencia de población por encima del 5% están

presentes en el genoma humano. Se ha desarrollado un mapa genético usando estos polimorfismos como una guía (<http://research.mershfieldclinic.org/genetics/>; dirección de Internet desde Febrero 13, 2003).

La frecuencia de alelos varía de SNP a SNP; la frecuencia de alelo para un SNP puede ser 50:50, mientras que la frecuencia de alelo para otro SNP puede ser 90:10. Entre más cercana la frecuencia del alelo a 50:50, es más probable que un individuo particular sea heterocigótico en ese SNP. El consorcio de SNP provee información de la frecuencia de alelo para algunos SNPs, pero no para otros.

www.snp.chsl.org. La frecuencia de alelo para un SNP particular provee información valiosa en cuanto a la utilidad de ese SNP para el método de detección prenatal no invasivo descrito en el Ejemplo 5. Aunque se pueden usar todos los SNPs, es preferible usar los SNPs con frecuencias de alelo más cercanas al 50:50.

En resumen, la sangre materna contiene ADN fetal. El ADN materno se puede distinguir del ADN fetal mediante el examen de los SNPs en donde la madre es heterocigótica. Por ejemplo, en el SNP X, el ADN materno puede ser homocigótico para guanina. Si el template de ADN obtenido del plasma de una hembra embarazada es heterocigótico, como se demostró mediante la detección de las señales correspondientes a un alelo de adenina y un alelo de guanina, el alelo de adenina se puede usar como una señal para el ADN fetal (ver Ejemplo 5). Entre más cerca la frecuencia del alelo de un SNP está a 50:50, es más probable que existan diferencias de alelo en un SNP particular entre el ADN materno y el ADN fetal.

Por ejemplo, si los alelos observados en un SNP son adenina y guanina, y el SNP tiene una frecuencia de alelo de 90(A):10(G), es probable que ambos, madre y padre sean homocigóticos para adenina en ese SNP particular. Así, tanto el ADN materno como el ADN fetal serán homocigóticos para adenina, y no hay señal diferente para el ADN fetal. Sin embargo, si en SNP X la frecuencia de alelo es 50:50, y la madre es homocigótica para adenina, la probabilidad de que el ADN paterno contenga un alelo de guanina en SNP X es más alta.

A continuación se provee un método para determinar la frecuencia de alelo para un SNP. Se analizaron siete SNPs localizados en el cromosoma 13. El método es aplicable para cualquier SNP incluyendo, sin limitarse a los SNPs en los cromosomas humanos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X y Y.

Preparación del Template de ADN

Para determinar la frecuencia del alelo de un SNP particular, se obtuvo ADN de doscientos cincuenta individuos después de obtener su consentimiento. De cada individuo se recogió una muestra de 9 ml de sangre en un tubo estéril (Fischer Scientific, tubos Vacuette con 9 ml de EDTA, número de catálogo NC9897284). Los tubos fueron centrifugados a 1000 rpm por diez minutos. El sobrenadante (el plasma) de cada muestra fue removido, y un mililitro de la muestra de sangre restante, que comúnmente se refiere como "cubierta amarilla" se transfirió a un tubo nuevo. Se agregó un mililitro de PBS 1X a cada muestra.

El template de ADN fue aislado usando el Kit QIAmp ADN Blood Midi, suministrado por QIAGEN (Número de catálogo 51183). El template de ADN fue aislado según las instrucciones incluidas en el Kit. Se recolectaron juntos 0.76 µg de ADN de cada individuo, y el ADN recolectado se usó en todas las reacciones posteriores.

Diseño de las Plantillas

El SNP TSC0903430 se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' GTCTTGCATGTAGAATTCTAGGGACGCTGCTTTTCGTC 3' (SEC ID No: 279)

Segunda plantilla:

5' CTCCTAGACATCGGGACTAGAATGTCCAC 3' (SEC ID No: 280)

La primera plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y se diseñó para recocerse a ochenta y dos bases del

sitio de interés. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC0337961 se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' ACACAAGGCAGAGAATTCCAGTCCTGAGGGTGGGGGCC 3' (SEC ID No: 281)

Segunda plantilla:

5' CCGTGTTTTAACGGGACAAGCTGTTCTTC 3' (SEC ID No: 282)

La primera plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y se diseñó para recocerse a noventa y dos bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC0786441 se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' GTAGCGGAGGTTGAATTCTATATGTTGTCTTGGACATT 3' (SEC ID No: 283)

Segunda plantilla:

5' CATCAGTAGAGTGGGACGAAAGTTCTGGC 3' (SEC ID No: 284)

La primera plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y se diseñó para recocerse a ciento cuatro bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC1168303 se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' ATCCACGCCGCAGAATTCGTATTCATGGGCATGTCAAA 3' (SEC ID No: 285)

Segunda plantilla:

5' CTTGGGACTATTGGGACCAGTGTTCAATC 3' (SEC ID No: 286)

La primera plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y se diseñó para recocerse a sesenta y cuatro bases

del sitio de interés. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC0056188 se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' CCAGAAAGCCGTGAATTCGTTAAGCCAACCTGACTCCA 3' (SEC ID No: 287)

Segunda plantilla:

5' TCGGGGTTAGTCGGGACATCCAGCAGCCC 3' (SEC ID No: 288)

La primera plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y se diseñó para recocerse a ochenta y dos bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC0466177 se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' CGAAGGTAATGTGAATTCCAAAACCTTAGTGCCACAATT 3' (SEC ID No: 289)

Segunda plantilla:

5' ATACCGCCCAACGGGACAGATCCATTGAC 3' (SEC ID No: 290)

La primera plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y se diseñó para recocerse a noventa y dos bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC0197424 se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' AGAAACCTGTAAGAATTCGATTCCAAATTGTTTTTTGG 3' (SEC ID No: 291)

Segunda plantilla:

5' CGATCATAGGGGGGGACAGGAGAGAGCAC 3' (SEC ID No: 292)

La primera plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y se diseñó para recocerse a ciento cuatro bases del

sitio de interés. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

La primera plantilla se diseñó para recocerse a varias distancias del sitio de interés. El experto entiende que la ubicación de recocido de la primera plantilla puede ser a cualquier distancia del puto de interés incluyendo, pero sin limitarse a 5-10, 11-15, 16-20, 21-25, 26-30, 31-35, 36-40, 41-45, 46-50, 51-55, 56-60, 61-75, 66-70, 71-75, 76-80, 81-85, 86-90, 91-95, 96-100, 101-105, 106-110, 111-115, 116-120, 121-125, 126-130, 131-140, 141-160, 161-180, 181-200, 201-220, 221-240, 241-260, 261-280, 281-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, 501-1000, 1001-2000, 2001-3000 o a más de 3000 bases.

Todos los sitios de interés fueron amplificados del template de ADN genómico usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR, Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202, incorporados aquí para referencia). En este ejemplo, los sitios de interés fueron amplificados en tubos de reacción separados, pero también pudieron ser amplificados juntos en una reacción de PCR simple. Para especificidad aumentada se usó una PCR de "inicio caliente". Las reacciones fueron realizadas usando el Kit HorStatTaq Master Mix suministrado por Qiagen (número de catálogo 203443). La cantidad de template de ADN y plantilla por reacción se puede optimizar para cada sitio de interés. En este ejemplo se usaron 40 ng de template de ADN genómico humano (una mezcla de template de ADN de 245 individuos) y 5 μ M de cada plantilla. Se realizaron cuarenta ciclos de PCR. Se usaron las siguientes condiciones de PCR:

- (1) 95°C por 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C por 30 segundos;
- (3) 95°C por 30 segundos;
- (4) 57°C por 30 segundos;
- (5) 95°C por 30 segundos;
- (6) 64°C por 30 segundos;
- (7) 95°C por 30 segundos;
- (8) Repite pasos 6 y 7 treinta y nueve (39) veces
- (9) 72°C por 5 minutos.

En el primer ciclo de PCR la temperatura de recocido estaba cerca de la temperatura de fusión de la región de recocido 3' de las segundas plantillas, que fue de 37°C. La temperatura de recocido en el segundo ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recoce al templete de ADN de la primera plantilla, que fue de 57°C. La temperatura de recocido del tercer ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla, que fue de 64°C. La temperatura de recocido para los ciclos restantes fue de 64°C. La escalación de la temperatura de recocido de TM1 a TM2 a TM3 en los tres primeros ciclos de PCR mejora la especificidad grandemente. Estas temperaturas de recocido son representativas, y el experto entenderá que las temperaturas de recocido de cada ciclo dependen de las plantillas específicas usadas.

Las temperaturas y tiempos para la desnaturalización, recocido y extensión se pueden optimizar probando varios ajustes y usando los parámetros que producen los mejores resultados.

Purificación del Fragmento de Interés

Los productos de PCR fueron separados de los reactivos de PCR no usados. Después de la reacción de PCR, ½ del volumen de reacción de SNP TSC0903430, SNP TSC 0337961 y SNP TSC0786441 fueron mezclados juntos en un tubo de reacción simple. La mitad de los volúmenes de reacción de los SNPs TCS1168303, TSC0056188, TSC466177 y TSC01947424 fueron recolectados juntos en un tubo de reacción simple. Las plantillas y los nucleótidos no-usados fueron removidos de la reacción usando los kits de purificación de PCR Qiagen MinElute (Qiagen, Número de catálogo 28004). Las reacciones fueron realizadas siguiendo las instrucciones del fabricante suministradas con las columnas.

Digestión de la enzima de restricción de los fragmentos aislados

Los productos de PCR purificados fueron digeridos con la enzima de restricción BsmF I, que se enlaza al sitio de reconocimiento incorporado en los productos de PCR de la segunda plantilla. Las digestiones fueron

realizadas en tubos eppendorf siguiendo las instrucciones suministradas con la enzima de restricción.

Incorporación del Nucleótido Marcado

La digestión de la enzima de restricción produjo un fragmento de ADN con una proyección 5' que contenía el sitio SNP o sitio de interés, y un extremo 3' suspendido. La proyección 5' funcionó como un template que permitió la incorporación de un nucleótido o nucleótidos en presencia de una polimerasa de ADN.

Como se discutió en detalle en el Ejemplo 6, se puede determinar la secuencia de ambos alelos en un SNP con un nucleótido marcado en presencia de otros nucleótidos no marcados. Se agregaron los siguientes componentes a cada reacción de llenado: 1 μ l de ddGTP marcado fluorescentemente, 0.5 μ l de ddNTPs no marcados (40 μ M), que contienen todos los nucleótidos excepto guanina, 2 μ l de buffer de secuenasa 10X, 0.25 μ l de Secuenasa, y agua según se necesite para una reacción de 20 μ l. La reacción de llenado se realizó a 40°C por 10 min. La Secuenasa fue la polimerasa de ADN usada en este ejemplo. Sin embargo, se puede usar cualquier polimerasa de ADN para una reacción de llenado incluyendo, pero sin limitarse a ADN polimerasa E.coli, fragmento Klenow de ADN polimerasa I E. coli, ADN polimerasa T7, ADN polimerasa T4, polimerasa Taq, ADN polimerasa Pfu, ADN polimerasa Vent, polimerasa de bacteriofago 29 y ADN polimerasa Genomic REDTaq™. El ddNTP marcado no-fluorescentemente se compró en Fermentas Inc. (Hanover, MD). Todos los otros reactivos de marcado se obtuvieron en Amersham (Kit Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Core, US 79565).

Detección del Sitio de Interés

La muestra fue cargada en una línea de un gel de acrilamida al 5% (urea) de 36 cm (Bio Whittaker Molecular Applications, Long Ranger Run Gel Packs, número de catálogo 50691). La muestra fue sometida a electroforesis

en el gel a 3000 voltios por 3 min. El gel se corrió por 3 horas en un aparato de secuenciamiento (Hoefer SQ3 Sequencer). El gel fue removido del aparato y rastreado en en el Typhoon 9400 Variable Mode Imager. El nucleótido marcado incorporado fue detectado mediante fluorescencia.

A continuación se reproduce un esquema de proyección 5' para SNP TSC0056188 (en donde R indica el sitio variable). La secuencia entera no se muestra, solo la porción de la proyección

5' CCA				
3' GGT	R	T	C	C
Posición de la proyección	1	2	3	4

Como se discutió en detalle en el Ejemplo 6, se puede usar un nucleótido marcado con una mitad química para determinar la secuencia de los alelos de un sitio de interés. Los nucleótidos observados para TCS0056188 en la dirección de la cadena de 5' (ilustrada aquí como la cadena superior) son adenina y guanina. El nucleótido en la posición tres de la proyección en la dirección contraria de la cadena es citosina, que es complementaria a guanina. Como el sitio variable puede ser adenina o guanina, se puede usar ddGTP marcado fluorescentemente en presencia de dCTP, dTTP y dATP no marcados, para determinar la secuencia de ambos alelos. Las reacciones de llenado para un individuo homocigótico para guanina, homocigótico para adenina, o heterocigótico están diagramadas a continuación.

Homocigótico adenina:

5' CCA	A	A	G*	
3' GGT	T	T	C	C
Posición de la proyección	1	2	3	4

Homocigótico guanina:

5' CCA	G*			
3' GGT	C	T	C	C
Posición de la proyección	1	2	3	4

214

Heterocigótico:

Alelo 1	5' CCA	G*			
	3' GGT	C	T	C	C
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCA	A	A	G*	
	3' GGT	T	T	C	C
Posición de la proyección		1	2	3	4

Como se muestra en la FIG. 14, se detectaron dos bandas para SNP TSC0056188. La banda más baja correspondía a moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición uno complementaria a la proyección, que es representativa del alelo guanina. La banda más alta, separada por una base simple de la banda más baja, correspondía a moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección. Esta banda representaba el alelo de adenina. La intensidad de cada banda era fuerte, indicando que cada alelo estaba bien representado en la población. El SNP TSC0056188 es representativo de un SNP con alta frecuencia de alelo.

A continuación se reproduce un esquema de proyección 5' generado después de la digestión con BsmF I, para SNP TSC0337961 (en donde R indica el sitio variable). La secuencia entera no se muestra, solo la porción de la proyección

5' GCCA				
3' CGGT	R	G	C	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

Los nucleótidos observados para SNP TSC0337961 en la dirección de la cadena de 5' (ilustrada aquí como la cadena superior) son adenina y guanina. La tercera posición en la proyección en la dirección contraria a la cadena era citosina, que es complementaria a guanina. Como el sitio variable puede ser adenina o guanina, se podían usar ddGTP marcado fluorescentemente en presencia de dCTP, dTTP y dATP no marcados, para

215

determinar la secuencia de ambos alelos. Las reacciones de llenado para un individuo homocigótico para guanina, homocigótico para adenina, o heterocigótico están diagramadas a continuación.

Homocigótico para guanina:

	5' GCCA	G*			
	3' CGGT	C	G	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Homocigótico para adenina:

	5' GCCA	A	C	G*	
	3' CGGT	T	G	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Heterocigótico:

Alelo 1	5' GCCA	G*			
	3' CGGT	C	G	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Alelo 2	5' GCCA	A	C	G*	
	3' CGGT	T	G	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

Como se ve en la FIG. 14, se observó una banda migrando en la posición de la banda de más bajo peso molecular esperada. Esta banda representaba las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición uno complementaria a la proyección, que representa el alelo de guanina. No se detectó banda correspondiente a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección. El SNP TSC0337961 es representativo de un SNP que no es altamente variable dentro de la población.

De los siete SNPs analizados, cuatro de los SNPs (TSC1168303, TSC0056188, TSC0466177 y TSC0197424) tenían altas frecuencias de alelo.

Se vieron dos bandas de alta intensidad para cada uno de los cuatro SNPs que indican que ambos alelos estaban bien representados en la población.

Sin embargo, no es necesario que los SNPs tengan frecuencias de alelo 50:50 para que sean útiles. Todos los SNPs proveen información útil. Los métodos descritos aquí proveen una técnica rápida para la determinación de la frecuencia de alelo en un SNP, o cualquier sitio variable incluyendo, pero sin limitars a mutaciones puntuales. Puede ser útiles las frecuencias de alelo de 50:50, 51:49, 52:48, 53:47, 54:46, 55:45, 56:46, 57:43, 58:42, 59:41, 60:40, 61:39, 62:38, 63:37, 64:36, 65:35, 66:34, 67:33, 68:32, 69:31, 70:30, 72:29, 72:28, 73:27, 74:26, 75:25, 76:24, 77:23, 78:22, 79:21, 80:20, 81:19, 82:18, 83:17, 84:16, 85:15, 86:14, 87:13, 88:12, 89:11, 90:10, 91:9, 92:8, 93:7, 94:6, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, 99:1 y 100:0.

Se vieron dos bandas para SNP TSC0903430. Una banda, la banda de peso molecular más bajo representaba las moléculas de ADN llenadas con ddGTP marcado. Se vió una banda de intensidad más débil para las moléculas llenadas con ddGTP marcado, en la posición 3 complementaria a la proyección, que representaba el alelo de citosina. El SNP TSC0903430 representa un SNP con una variación de frecuencia de alelo. En la población, la mayoría de los individuos portan el alelo guanina, pero el alelo de citosina aún está presente.

Se vió una banda de alta intensidad para SNP TSC0337961 y SNP TSC0786441. La banda detectada para SNP TSC0337961 y SNP TSC0786441 correspondía a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección. No se detectó señal de las moléculas de ADN que hubieran sido llenadas en la posición 3 complementaria a la proyección, que hubieran representado al segundo alelo. El SNP TSC0337961 y el SNP TSC0786441 representan SNPs con pequeña variabilidad en la población.

Como se demuestra en el FIG. 14, la primera plantilla usado para amplificar cada sitio de interés se puede diseñar para recocerse a varias distancias del sitio de interés. Esto permite analizar múltiples SNPs en la misma reacción. Mediante el diseño de la primera plantilla para recocerse a distancias especificadas del sitio de interés, se puede analizar cualquier

número de sitios de interés en una reacción simple que incluye, pero sin limitarse a 1-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90, 91-100, 101-110, 111-120, 121-130, 131-140, 141-150, 151-160, 161-170, 171-180, 181-190, 191-200, 201-300, 301-400, 401-500 y mas de 500.

Como se discutió en el Ejemplo 6, algunas enzimas de restricción tipo IIS muestran modelos de corte alternos. Por ejemplo, la enzima de restricción tipo IIS BsmF I típicamente corta a 10/14 de su sitio de ligamiento; sin embargo, la enzima también puede cortar a 11/15 del sitio de ligamiento. Para eliminar el efecto del corte alterno, los nucleótidos marcados usados para la reacción de llenado deben ser escogidos de forma que no sean complementarios en la posición 0 de la proyección generado por el corte a 11/15 (discutido en detalle en el Ejemplo 6). Por ejemplo, si se marca con ddGTP, el nucleótido anterior al sitio variable en la cadena que es llenada no debe ser una guanina.

La proyección 11/15 generado por BsmF I para SNP TSC0056188 está ilustrado a continuación, con el sitio variable en negrita.

Proyección 11/15 para TSC0056188

Alelo 1	5' CC				
	3' GG	T	C	T	C
Posición de la proyección		0	1	2	3
Alelo 2	5' CC				
	3' GG	T	T	T	C
Posición de la proyección		0	1	2	3

Después de la reacción de llenado con ddGTP marcado, dATP, dTTP y dCTP no marcados, se generaron las siguientes moléculas:

Alelo 1 11/15	5' CC	A	G*		
	3' GG	T	C	T	C
Posición de la proyección		0	1	2	3
Alelo 2 11/15	5' CC	A	A	A	G*

3' GG	T	T	T	C
Posición de la proyección	0	1	2	3

Se vieron dos señales; una banda correspondía a moléculas llenadas con ddGTP en la posición uno de la proyección, y la otra banda correspondía a las moléculas llenadas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección. Estas son las mismas moléculas de ADN generadas después de la reacción de llenado de la proyección 10/14. Así, las dos bandas pueden ser comparadas sin ninguna ambigüedad del corte alterno. Este método de marcado con un nucleótido simple elimina cualquier error generado por las propiedades de corte alterno de las enzimas.

Los métodos descritos aquí son aplicables para determinar la frecuencia de alelo de cualquier SNP incluyendo, pero sin limitarse a los SNPs en los cromosomas humanos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X y Y.

EJEMPLO 9

Los SNPs heterocigóticos por definición difieren en un nucleótido. En un SNP heterocigótico, el alelo 1 y el alelo 2 pueden estar presentes en una relación 1:1. Sin embargo, es posible que las polimerasas de ADN puedan incorporar un nucleótido a una velocidad más rápida que otros nucleótidos, y así, la relación observada de un SNP heterocigótico puede ser diferente de la relación teórica esperada de 1:1.

A continuación se describen métodos que permiten una cuantificación precisa y eficiente de la relación esperada de alelo 1 a alelo 2 en un SNP heterocigótico.

Preparación del Template de ADN

Se obtuvo una muestra de template de ADN de veinte cuatro individuos después de haber dado su consentimiento. De cada individuo se recolectó una muestra de 9 ml de sangre en un tubo estéril (Fisher

Scientific, tubos Vacuette con 9 ml de EDTA, número de catálogo NC9897284). Los tubos fueron agitados a 1000 rpm por diez minutos sin freno. El sobrenadante (el plasma) de cada muestra fue removido, y un mililitro de la muestra de sangre restante, que se refiere comúnmente como la "cubierta amarilla" se transfirió a un nuevo tubo. Se agregó un mililitro de PBS 1X a cada muestra.

El template de ADN se aisló usando el Kit QIAmp ADN Blood Midi suministrado por QIAGEN (número de catálogo 51183). El template de ADN se aisló según las instrucciones incluidas en el kit.

Diseño de las Plantillas

El SNP TSC0607185 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' ACTTGATTCCGTGAATTCGTTATCAATAAATCTTACAT 3' (SEC ID No: 40)

Segunda plantilla:

5' CAAGTTGGATCCGGGACCCAGGGCTAACC 3' (SEC ID No: 41)

El SNP TSC1130902 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' TCTAACCATTGCGAATTCAGGGCAAGGGGGGTGAGATC 3' (SEC ID No: 34)

Segunda plantilla:

5' TGACTTGGATCCGGGACAACGACTCATCC 3' (SEC ID No: 35)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I. La primera plantilla fue diseñado para recocerse a varias distancias del sitio de interés.

Todos los sitios de interés fueron amplificados del template de ADN genómico usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR, Patentes U.S.

Nos. 4,683,195 y 4,683,202, incorporadas a este como referencia). En este ejemplo, el sitio de interés fue amplificado en tubos de reacción separados, aunque también se podían amplificar juntos en una reacción de PCR simple. Para especificidad aumentada se usó una PCR de "inicio caliente". Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el Kit HotStarTaq Master Mix suministrado por QIAGEN (número de catálogo 203443). La cantidad de template de ADN y de plantilla por reacción se puede optimizar para cada sitio de interés, pero en este ejemplo se usaron 40 ng de template de ADN genómico humano y 5 μ M de cada primer. Se realizaron cuarenta ciclos de PCR. Se usaron las siguientes condiciones de PCR:

- (1) 95°C por 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C por 30 segundos;
- (3) 95°C por 30 segundos;
- (4) 57°C por 30 segundos;
- (5) 95°C por 30 segundos;
- (6) 64°C por 30 segundos;
- (7) 95°C por 30 segundos;
- (8) Repite pasos 6 y 7 treinta y nueve (39) veces;
- (9) 72°C por 5 minutos;

En el primer ciclo de PCR la temperatura de recocido estaba cerca de la temperatura de fusión de la región de recocido 3' de las segundas plantillas, que fue de 37°C. La temperatura de recocido en el segundo ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recoce al template de ADN de la primera plantilla, que fue de 57°C. La temperatura de recocido del tercer ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla, que fue de 64°C. La temperatura de recocido para los ciclos restantes fue de 64°C. La escalación de la temperatura de recocido de TM1 a TM2 a TM3 en los tres primeros ciclos de PCR mejora la especificidad grandemente. Estas temperaturas de recocido son representativas, y el experto entenderá que las temperaturas de recocido de cada ciclo dependen de las plantillas específicas usadas.

Las temperaturas y tiempos para la desnaturalización, recocido y extensión se pueden optimizar probando varios ajustes y usando los parámetros que produjeron los mejores resultados.

Purificación del Fragmento de Interés

Los productos de PCR fueron separados del template de ADN genómico. La mitad de la reacción de PCR se transfirió a un agujero de una placa Streptawell transparente de Alto Enlace, de Roche Diagnostics GmbH (número de catálogo 1 645 692, como se lista en Roche Molecular Biochemicals, Catálogo de Bioquímicos 2001). Las primeras plantillas contenían un marcador de biotina 5' de forma que los productos de PCR se enlazaron a los agujeros recubiertos de Estreptavidina, mientras que el template de ADN genómico no lo hizo. La reacción de ligamiento de estreptavidina se realizó usando un Termomezclador (Eppendorf) a 1000 rpm por 20 min., a 37°C. Cada agujero fue aspirado para remover el material no enlazado, y fue lavado tres veces con PBS 1X, con cuidadoso mezclado (Kandpal et al., Nucl. Acid Res. 18:1789-1795 (1990)); Kaneoka et al., Biotechniques 10:30-34 (1991); Green et al., Nucleic Acids Res. 18:6163-6164 (1990)).

Digestión de la enzima de restricción de los fragmentos aislados

Los productos de PCR purificados fueron digeridos con la enzima de restricción BsmF I, que se enlaza al sitio de reconocimiento incorporado en los productos de PCR de la segunda plantilla. Las digestiones fueron realizadas en los streptawells, siguiendo las instrucciones suministradas con la enzima de restricción. Después de la digestión, los agujeros fueron lavados tres veces con PBS para remover los fragmentos clivados.

Incorporación del Nucleótido Marcado

La digestión de la enzima de restricción con BsmF I produjo un fragmento de ADN con una proyección 5', que contenía el sitio SNP o sitio

de interés, y un extremo 3' suspendido. La proyección 5' funcionó como un templete que permitía la incorporación de un nucleótido o nucleótidos en presencia de una polimerasa de ADN.

Como se discutió en detalle en el Ejemplo 6, la secuencia de ambos alelos de un SNP se puede determinar mediante el llenado con un nucleótido marcado, en presencia de otros nucleótidos no marcados. Se agregaron los siguientes componentes a cada reacción de llenado: 1 μ l de ddGTP marcado fluorescentemente, 0.5 μ l de ddNTPs no marcados (40 μ M), que contenían todos los nucleótidos excepto guanina, 2 μ l de buffer de secuenasa 10X, 0.25 μ l de Secuenasa, y agua según se necesite para una reacción de 20 μ l. La reacción de llenado se realizó a 40°C por 10 min. El ddNTP marcado no-fluorescentemente se compró en Fermentas Inc. (Hanover, MD). Todos los otros reactivos de marcado se obtuvieron en Amersham (Kit Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Core, US 79565).

Después del marcado, cada streptawell fue lavado con PBS 1X (100 μ l) tres veces. Los fragmentos de ADN "llenados" fueron luego liberados de los streptawell mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI, según las instrucciones del fabricante que fueron suministradas con la enzima. La digestión se realizó por 1 hora a 37°C con agitación a 120 rpm.

Detección del Sitio de interés

Las muestras fueron cargadas en una línea de un gel de acrilamida al 5% (urea) de 36 cm (Bio Whittaker Molecular Applications, Long Ranger Run Gel Packs, número de catálogo 50691). Las muestras se sometieron a electroforesis en el gel a 3000 voltios por 3 min. El gel se corrió por 3 horas en un aparato de secuenciamiento (Hoefer SQ3 Sequencer). El gel fue removido del aparato y fue rastreado en el Typhoon 9400 Variable Mode Imager. El nucleótido marcado incorporado fue detectado mediante fluorescencia. Se extrajo una caja alrededor de cada banda, y la intensidad de la banda se calculó usando el software de Typhoon 9400 Variable Mode Imager.

A continuación se muestra un esquema de proyección 5' para SNP TSC0607185. La secuencia entera no se reproduce, solo la porción que muestra la proyección (en donde R indica el sitio variable)

C	C	T	R	TGTC 3'
				ACAG 5'
4	3	2	1	Posición de la proyección

Los nucleótidos observados en el sitio variable para TSC0607185 en la dirección de la cadena de 5' (descrita aquí como la cadena superior) son citosina y timidina (descrita como R). En este caso, la segunda plantilla se recoge del sitio de interés, que permite que la reacción de llenado ocurra en la dirección contraria de la cadena (descrita aquí como la cadena del fondo). La dirección contraria de la cadena será llenada con guanina o adenina.

La segunda posición en la proyección 5' es timidina, que es complementaria a adenina, y la tercera posición en la proyección corresponde a citosina, que es complementaria a guanina. Se usó el ddGTP marcado fluorescentemente en presencia de dCTP, dTTP y dATP no marcados para determinar la secuencia de ambos alelos. Después de la reacción de llenado se generaron las siguientes moléculas de ADN:

C	C	T	C	TGTC 3'	Alelo 1
			G*	ACAG 5'	
4	3	2	1	Posición de la proyección	
C	C	T	T	TGTC 3'	Alelo 2
	G*	A	A	ACAG 5'	
4	3	2	1	Posición de la proyección	

La proyección generado por BsmF I cortado a 11/15 del sitio de reconocimiento en TSC0607185 se describe a continuación:

C	T	R	T	GTC 3'	11/15
				CAG 5'	
3	2	1	0	Posición de la proyección	

Como se usó ddGTP marcado para la reacción de llenado, no se generará señal nueva de las moléculas cortadas a 11/15 del sitio de reconocimiento. La posición 0 complementaria a la proyección fue llenada con dATP no marcado. Solo se vieron señales generadas de las moléculas llenadas con ddGTP marcado en la posición 0 complementaria a la proyección, o de moléculas llenadas con ddGTP marcado en la posición 3 complementaria a la proyección.

Cinco de los veinticuatro individuos fueron heterocigóticos para SNP TSC0607185. Como se muestra en la FIG.15, se detectaron dos bandas. La banda de peso molecular más bajo correspondía a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección. La banda de peso molecular más alto correspondía a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección.

La relación de los dos alelos se calculó para cada una de las muestras heterocigóticas (ver Tabla XVI). La relación promedio de alelo 2 a alelo 1 fue 1.000, con una desviación estándar de 0.044. De este modo, la relación de alelo en SNP TSC0607185 era altamente consistente. La relación de alelo calculada experimentalmente para un SNP particular se refiere de aquí en adelante como el valor "p" del SNP. El análisis del SNP TSC0607185 proveerá consistentemente una relación de alelo de 1:1, siempre y cuando el número de genomas analizados sea de suficiente cantidad para que no se genere un error del muestreo estadístico.

Si la muestra contenía un número bajo de genomas, es estadísticamente posible que las plantillas se cosan a un cromosoma sobre otro cromosoma. Por ejemplo, si la muestra contiene 40 genomas, que corresponde a un número total de 40 cromosomas de alelo 1 y 40 cromosomas de alelo 2, las plantillas se pueden recocer a 40 cromosomas de alelo 1, pero solo a 35 cromosomas del alelo 2. Esto causaría que el alelo 1 se amplificara preferencialmente al alelo 2, lo que alteraría la relación de alelo 1 a alelo 2. Este problema se elimina al tener un número suficiente de genomas en la muestra.

El SNP TSC0607185 representa un SNP en donde la diferencia en el nucleótido en el sitio variable no afecta la reacción de PCR, o la digestión

con la enzima de restricción o la reacción de llenado. El uso de un nucleótido marcado con un colorante fluorescente asegura que las bandas para un alelo se puedan comparar en forma precisa con las bandas para el segundo alelo. No hay la complicación agregada de tener que comparar entre dos líneas diferentes, o tener que corregir los coeficientes cuánticos de los colorantes. Adicionalmente, se ha removido cualquier efecto de las propiedades de corte alterno de las enzimas de restricción tipo IIS.

TABLA XVI. Relación de alelo 1 a alelo 2 en los SNPs TSC0607185 y TSC1130902.

SNP TSC0607185				SNP TSC1130902		
Muestra	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 2/ Alelo 1	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 2/ Alelo 1
1	2382	2313	0.971033	5877	4433	0.754296
2	1581	1533	0.969639	3652	2695	0.737952
3	1795	1879	1.046797	5416	3964	0.730059
4	1921	1855	0.965643	3493	2663	0.762382
5	1618	1701	1.051298	3894	2808	0.721109
Promedio			1.000882			0.74116
STD			0.044042			0.017018

A continuación se ilustra un esquema de proyección 5' para SNP TSC1130902. La secuencia entera de ADN no se reproduce, solo la porción que muestra la proyección (en donde R indica el sitio variable).



Los nucleótidos observados para TCS1130902 en la dirección de la cadena 5' (descrito aquí como la cadena superior) con adenina y guanina. La segunda posición en la proyección corresponde a timidina, y la tercera posición en la proyección corresponde a citosina, que es complementaria a guanina. Se usó ddGTP marcado fluorescentemente en presencia de dCTP, dTTP y dATP no marcados, para determinar la secuencia de ambos alelos.

Después de la reacción de llenado se generaron las siguientes moléculas de ADN:

Alelo 1	5' TTCAT	G*			
	3' AAGTA	C	T	C	C
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' TTCAT	A	A	G*	
	3' AAGTA	T	T	C	C
Posición de la proyección		1	2	3	4

Como se muestra en la FIG. 15, se detectaron dos bandas. La banda de peso molecular más bajo correspondía a moléculas llenadas con ddGTP marcado en la posición 1 complementaria a la proyección (el alelo G). La banda de peso molecular más alto, separada de la banda más baja por una base simple, correspondía a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección (el alelo A).

Cinco de los veinticuatro individuos fueron heterocigóticos para SNP TSC1130902. Como se ve en la FIG. 15, la banda correspondiente al alelo 1 era más intensa que la banda correspondiente al alelo 2. Est se vió para cada uno de los cinco individuos. La intensidad real de la banda correspondiente al alelo 1 varió de individuo a individuo pero siempre fue más intensa que la banda correspondiente al alelo 2. Para los cinco individuos, la relación promedio de alelo 2 a alelo 1 fue de 0.74116, con una desviación estándar de 0.017018.

El template de ADN se preparó de cinco individuos diferentes. Se realizaron las reacciones de PCR separadas, las digestiones de enzima de restricción separadas, y las reacciones de llenado separadas. Sin embargo, para cada template de ADN, la relación de alelo 2 a alelo 1 fue de aproximadamente 0.75. El valor "p" para este SNP fue altamente consistente.

Por ejemplo, para SNP TSC1130902, el valor "p" fue de 0.75. Cualquier desviación de este valor, siemore y cuando la muestra contenga un número adecuado de genomas para remover los errores de muestreo

estadístico, indicará que hay un número anormal de copias del cromosoma 13. Si hay una copia adicional de alelo 2, el valor "p" será mayor del 0.75 esperado. Sin embargo, si hay una copia adicional de alelo 1, el valor "p" será menor que el 0.75 esperado. Con el valor "p" cuantificado para un SNP particular, ese SNP se puede usar para determinar la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica. Un valor "p" preciso, medido para un SNP simple será suficiente para detectar la presencia de una anomalía cromosómica.

Hay varias explicaciones posibles de porque la relación de un alelo a otro alelo en algún SNP varía de la reacción teóricamente esperada de 1:1. Primero, es posible que la polimerasa de ADN incorpore un nucleótido más rápido que el otro nucleótido. Como los alelos son amplificados por PCR, incluso una pequeña preferencia por un nucleótido sobre otro nucleótido puede causar variación de la relación esperada de 1:1. Esta preferencia potencial para un nucleótido doble el otro no se ve durante la reacción de llenado porque se usa un nucleótido marcado simple con un colorante.

También es posible que el nucleótido variable en el sitio SNP influya en la tasa de desnaturalización de los dos alelos. Si el alelo 1 contiene una guanina y el alelo 2 contiene una adenina, la diferencia entre la fuerza de ambos enlaces para estos nucleótidos puede afectar la tasa a la cual las cadenas de ADN se separan. De nuevo, es importante mencionar que los alelos son amplificados por PCR, y diferencias muy delicadas pueden causar un gran impacto en el resultado final. También es posible que el nucleótido variable en el sitio SNP influya en la tasa a la cual las dos cadenas se recocen después de la separación.

Alternativamente, es posible que la enzima de restricción tipo IIS corte un alelo preferencialmente sobre el otro alelo. Como se discutió anteriormente, la enzima de restricción tipo IIS se corta a una distancia del sitio de reconocimiento. Es posible que el nucleótido variable en el sitio SNP influya en la eficiencia de la digestión de la enzima de restricción. Es posible que en algunos SNPs, la enzima de restricción corte un alelo con una eficiencia del 100%, mientras que corta el otro alelo con una eficiencia del 90%.

Sin embargo, el hecho que la relación de alelo 1 a alelo 2 se desvíe de la relación teórica esperada de 1:1 no influye o reduce la utilidad de ese SNP. Como se demostró anteriormente, el valor "p" para cada SNP es consistente entre diferentes individuos.

Se puede calcular el valor "p" para cualquier SNP mediante el análisis del template de ADN de cualquier número de individuos heterocigóticos que incluye, sin limitarse a 1-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90, 91-100, 101-110, 111-120, 121-130, 131-140, 141-150, 151-160, 161-170, 171-180, 181-190, 191-200, 201-210, 211-220, 221-230, 231-240, 241-250, 251-260, 261-270, 271-280, 281-290, 291-300 y más de 300.

Los métodos descritos aquí permiten determinar el valor "p" para cualquier SNP. Es posible que algunos SNPs se comporten más consistentemente que otros SNPs. En el genoma humano hay más de 3 millones de SNPs; no es posible especular cómo se comportará cada SNP. El valor "p" de cada SNP se determinará experimentalmente. Los métodos descritos aquí permiten la identificación de los SNPs que tienen valores "p" altamente consistentes y reproducibles.

EJEMPLO 10

Como se discutió en el Ejemplo 2, la relación de un alelo al otro alelo en un SNP particular puede variar de la relación teóricamente esperada de 50:50. Estos SNPs se pueden usar para detectar la presencia de cromosomas adicionales, siempre y cuando la relación de un alelo al otro alelo permanezca lineal en los individuos con desórdenes cromosómicos. Por ejemplo, en el SNP X, si el porcentaje de alelo 1 a alelo 2 es 75:25, el porcentaje esperado de alelo 1 a alelo 2 para un individuo con Síndrome de Down debe ser ajustado apropiadamente para reflejar la variación del porcentaje esperado en este SNP.

El porcentaje de alelo 1 a alelo 2 para SNP TSC0108992 en el cromosoma 21 se calculó usando el template de ADN de individuos normales y template de ADN de un individuo con Síndrome de Down. Como

se demuestra a continuación, el porcentaje de un alelo al otro alelo fue consistente y permaneció lineal en un individuo con Síndrome de Down.

Preparación del Template de ADN

El ADN fue obtenido de cuatro individuos con un cariotipo genético normal, y un individuo al que se le identificó que tenía una copia extra de cromosoma 21 (Síndrome de Down). Se obtuvo el consentimiento de todos los individuos. También se obtuvo el consentimiento de los padres del individuo con Síndrome de Down.

De cada individuo se recolectó una muestra de 9 ml de sangre en un tubo estéril (Fisher Scientific, tubos Vacuette con 9 ml de EDTA, número de catálogo NC9897284). El ADN fue aislado usando el Kit QIAmp ADN Blood Midi suministrado por QIAGEN (número de catálogo 51183). El template de ADN se aisló según las instrucciones incluidas en el kit.

Diseño de las Plantillas

El SNP TSC0108992 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' CTACTGAGGGCTCGTAGATCCCAATTCCTTCCCAAGCT 3' (SEC ID No: 293)

Segunda plantilla:

5' AATCCTGCTTTAGGGACCATGCTGGTGGGA 3' (SEC ID No: 294)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I. El SNP TSC0108992 se amplió del template de ADN genómico usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR, Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202, incorporadas a este como referencia).

Para especificidad aumentada se usó una PCR de "inicio caliente". Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el Kit HotStarTaq Master Mix suministrado por QIAGEN (número de catálogo 203443). La cantidad de

template de ADN y de plantilla por reacción se puede optimizar para cada sitio de interés. En este ejemplo se usaron 50 ng de template de ADN genómico humano y 5 μ M de cada primer. Se realizaron treinta y ocho ciclos de PCR. Se usaron las siguientes condiciones de PCR:

- (1) 95°C por 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C por 30 segundos;
- (3) 95°C por 30 segundos;
- (4) 57°C por 30 segundos;
- (5) 95°C por 30 segundos;
- (6) 64°C por 30 segundos;
- (7) 95°C por 30 segundos;
- (8) Repite pasos 6 y 7 treinta y siete (37) veces;
- (9) 72°C por 5 minutos;

En el primer ciclo de PCR la temperatura de recocido estaba cerca de la temperatura de fusión de la región de recocido 3' de las segundas plantillas, que fue de 37°C. La temperatura de recocido en el segundo ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recoca al template de ADN de la primera plantilla, que fue de 57°C. La temperatura de recocido del tercer ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla, que fue de 64°C. La temperatura de recocido para los ciclos restantes fue de 64°C. La escalación de la temperatura de recocido de TM1 a TM2 a TM3 en los tres primeros ciclos de PCR mejora la especificidad grandemente. Estas temperaturas de recocido son representativas, y el experto entenderá que las temperaturas de recocido de cada ciclo dependen de las plantillas específicas usadas.

Las temperaturas y tiempos para la desnaturalización, recocido y extensión se pueden optimizar probando varios ajustes y usando los parámetros que produjeron los mejores resultados.

Purificación del Fragmento de Interés

Los productos de PCR fueron separados del template de ADN genómico. Cada producto de reacción de PCR fue dividido en dos muestras y transferido en dos agujeros separados de una placa Streptawell transparente de Alto Enlace, de Roche Diagnostics GmbH (número de catálogo 1 645 692, como se lista en Roche Molecular Biochemicals, Catálogo de Bioquímicos 2001). Para cada reacción de PCR hubo dos réplicas; cada una en un agujero separado de la placa microtituladora. La primera plantilla contenía un marcador de biotina 5' de forma que los productos de PCR se enlazaron a los agujeros recubiertos de Estreptavidina, mientras que el template de ADN genómico no lo hizo. La reacción de ligamiento de estreptavidina se realizó usando un Termomezclador (Eppendorf) a 1000 rpm por 20 min., a 37°C. Cada agujero fue aspirado para remover el material no enlazado, y fue lavado tres veces con PBS 1X, con cuidadoso mezclado (Kandpal et al., Nucl. Acid Res. 18:1789-1795 (1990)); Kaneoka et al., Biotechniques 10:30-34 (1991); Green et al., Nucleic Acids Res. 18:6163-6164 (1990)).

Digestión de la enzima de restricción de los fragmentos aislados

Los productos de PCR purificados fueron digeridos con la enzima de restricción BsmF I, que se enlaza al sitio de reconocimiento incorporado en los productos de PCR de la segunda plantilla. Las digestiones fueron realizadas en los streptawells, siguiendo las instrucciones suministradas con la enzima de restricción. Después de la digestión, los agujeros fueron lavados tres veces con PBS 1X para remover los fragmentos clivados.

Incorporación del Nucleótido Marcado

La digestión de la enzima de restricción con BsmF I produjo un fragmento de ADN con una proyección 5', que contenía el sitio SNP o sitio de interés, y un extremo 3' suspendido. La proyección 5' funcionó como un template que permitía la incorporación de un nucleótido o nucleótidos en presencia de una polimerasa de ADN.

Como se discutió en detalle en el Ejemplo 6, la secuencia de ambos alelos de un SNP se puede determinar con un nucleótido marcado, en presencia de otros nucleótidos no marcados. Se agregaron los siguientes

componentes a cada reacción de llenado: 1 µl de ddTTP marcado fluorescentemente, 0.5 µl de ddNTPs no marcados (40 µM), que contenían todos los nucleótidos excepto timidina, 2 µl de buffer de secuenasa 10X, 0.25 µl de Secuenasa, y agua según se necesite para una reacción de 20 µl. La reacción de llenado se realizó a 40°C por 10 min. El ddNTP marcado no-fluorescentemente se compró en Fermentas Inc. (Hanover, MD). Todos los otros reactivos de marcado se obtuvieron en Amersham (Kit Thermo Sequenase Dye Terminador Cycle Sequencing Core, US 79565).

Después del marcado, cada agujero streptawell fue lavado con PBS 1X (100 µl) tres veces. Los fragmentos de ADN "llenados" fueron luego liberados de los streptawell mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI, según las instrucciones del fabricante que fueron suministradas con la enzima. La digestión se realizó por 1 hora a 37°C con agitación a 120 rpm.

Detección del Sitio de interés

Las muestras fueron cargadas en una línea de un gel de acrilamida al 5% (urea) de 36 cm (Bio Whittaker Molecular Applications, Long Ranger Run Gel Packs, número de catálogo 50691). Las muestras se sometieron a electroforesis en el gel a 3000 voltios por 3 min. El gel se corrió por 3 horas en un aparato de secuenciamiento (Hoefer SQ3 Sequencer). El gel fue removido del aparato y fue rastreado en el Typhoon 9400 Variable Mode Imager. El nucleótido marcado incorporado fue detectado mediante fluorescencia. Se extrajo una caja alrededor de cada banda, y la intensidad de la banda se calculó usando el software de Typhoon 9400 Variable Mode Imager.

A continuación se muestra un esquema de proyección 5' para SNP TSC0108992. La secuencia entera de ADN no se reproduce, solo la porción que muestra la proyección (en donde R indica el sitio variable)

				GTCC 3'
G	A	C	R	CAGG 5'
4	3	2	1	Posición de la proyección

Los nucleótidos observados en el sitio variable para SNP TSC0108992 son adenina timidina en la dirección de la cadena (descrita aquí como la cadena superior). La posición 3 de la proyección corresponde a adenina, que es complementaria a timidina. Se usó el ddTTP marcado en presencia de dATP, dCTP y dGTP no marcados. Después de la reacción de llenado con ddTTP, se generaron las siguientes moléculas de ADN:

	T*	G	A	GTCC 3'	Alelo 1
G	A	C	T	CAGG 5'	
4	3	2	1	Posición de la proyección	

			T*	GTCC 3'	Alelo 2
G	A	C	A	CAGG 5'	
4	3	2	1	Posición de la proyección	

No hubo dificultad para comparar los valores obtenidos del alelo 1 al alelo 2 porque se usó un nucleótido marcado para la reacción de llenado, y la reacción de llenado de ambos alelos se realizó en un tubo simple. Las propiedades de corte alterno de BsmF I no influyeron este análisis porque la proyección 11/15 sería llenado justo como la proyección 10/14. Los esquemas de las proyecciones 11/15 llenados están descritos a continuación:

T*	G	A	G	TCC 3'	Alelo 1 11/15
A	C	T	C	AGG 5'	
3	2	1	0	Posición de la proyección	

		T*	G	TCC 3'	Alelo 2 11/15
A	C	A	C	AGG 5'	
3	2	1	0	Posición de la proyección	

Como se ve en la FIG. 16, se vieron dos bandas para cada muestra de ADN. La banda de peso molecular más bajo correspondía a las moléculas de ADN llenadas con ddTTP en la posición uno complementaria a la proyección, y la banda de peso molecular más alto correspondía a las moléculas de ADN llenadas con ddTTP en la posición 3 complementaria a la proyección.

El porcentaje de alelo 2 a alelo 1 fue altamente consistente (ver Tabla XVII). Además, para cualquier individuo dado, las réplicas de la reacción de PCR mostraron resultados similares (ver Tabla XVII). El porcentaje de alelo 2 a alelo 1 se calculó dividiendo el valor de alelo 2 entre la suma de los valores de alelo 1 y alelo 2 (alelo 2/(alelo 1 + alelo 2)). De cuatro individuos, el porcentaje promedio de alelo 2 a alelo 1 fue de 0.4773 con una desviación estándar de 0.0097. El porcentaje de alelo 2 a alelo 1 en el template de ADN aislado de un individuo con Síndrome de Down fue de 0.3086.

El porcentaje teóricamente esperado de alelo 2 a alelo 1 usando el template de ADN de un individuo normal es 0.50. Sin embargo, el porcentaje determinado experimentalmente fue de 0.4773. El porcentaje teóricamente esperado de alelo 2 a alelo 2 para un individuo con una copia extra de cromosoma 21 es de 0.33. El porcentaje determinado experimentalmente de alelo 2 a alelo 1 para SNP TSC0108992 fue de 0.3086.

La desviación del porcentaje teóricamente esperado es altamente consistente y permanece lineal. La siguiente formula demuestra que el porcentaje de alelo 2 a alelo 1 en SNP TSC0108992 permanece lineal incluso en un template de ADN obtenido de un individuo con una copia extra de cromosoma 21:

$$\frac{0.47}{0.50} = \frac{X}{0.33}$$

$$X = 0.3102$$

Si se determina que el porcentaje de alelo 2 a alelo 1 usando template de ADN obtenido de un individuo normal es de 0.47, entonces el porcentaje de alelo 2 a alelo 1 usando template de ADN obtenido de un individuo con Síndrome de Down debería ser de 0.3102. La relación determinada experimentalmente fue de 0.3086, con una desviación estándar de 0.00186. No hay diferencia entre el porcentaje predicho y el porcentaje determinado experimentalmente de alelo 2 a alelo 1 en el template de ADN de un individuo con Síndrome de Down.

El porcentaje de un alelo al otro en un SNP particular es altamente consistente, reproducible y lineal. Esto demuestra que cualquier SNP, sin importar el porcentaje calculado de un alelo a otro alelo, se puede usar para determinar la presencia o ausencia de un desorden cromosómico.

TABLA XVII. Porcentaje de Alelo 2 a Alelo 1 en SNP TSC0108992.

Muestra	Alelo 2	Alelo 1	2/(2+1)
1A	9568886	10578972	0.474933
1B	8330864	9221381	0.474632
2A	9801053	10345444	0.486489
2B	8970942	9603102	0.482983
3A	8676718	9211085	0.485063
3B	10847024	11420943	0.487113
4A	10512420	12227107	0.462297
4B	7883584	9055289	0.465414
		MEDIA	0.477366
		DESV. STD.	0.009654
DS	6797400	15138959	0.309869
DS	6025753	13586890	0.307238
		MEDIA	0.308554
		DESV. STD	0.00186

EJEMPLO 11

El porcentaje de alelo 2 a alelo 1 para un SNP particular es altamente consistente. La desviación estadísticamente significativa de la relación determinada experimentalmente indica la presencia de una anomalía cromosómica. A continuación se calcula el porcentaje de alelo 2 a alelo 1 en el SNP TSC0108992 en el cromosoma 21 usando un template de ADN de un individuo normal y template de ADN de un individuo con Síndrome de Down.

Las mezclas que contenían varias cantidades de ADN normal y ADN con Síndrome de Down fueron preparadas y analizadas en una manera ciega.

Preparación del Template de ADN

El ADN fue obtenido de cuatro individuos con un cariotipo genético normal, y un individuo que tenía una copia extra de cromosoma 21 (Síndrome de Down). Se obtuvo el consentimiento de ambos individuos. También se obtuvo el consentimiento de los padres del individuo con Síndrome de Down.

De cada individuo se recolectó una muestra de 9 ml de sangre en un tubo estéril (Fisher Scientific, tubos Vacuette con 9 ml de EDTA, número de catálogo NC9897284). El ADN fue aislado usando el Kit QIAmp ADN Blood Midi suministrado por QIAGEN (número de catálogo 51183). El template de ADN se aisló según las instrucciones incluidas en el kit.

Mezclas de Template de ADN

El template de ADN del individuo de cariotipo normal y el ADN del individuo con una copia extra del cromosoma 21 fueron diluidos a una concentración de 10 ng/ μ l. Se hicieron cuatro mezclas de template de ADN normal y template de ADN de Síndrome de Down de la siguiente manera:

- Mezcla 1: 32 μ l de ADN Normal + 8 μ l de ADN de Síndrome de Down
- Mezcla 2: 28 μ l de ADN Normal + 12 μ l de ADN de Síndrome de Down
- Mezcla 3: 20 μ l de ADN Normal + 20 μ l de ADN de Síndrome de Down
- Mezcla 4: 10 μ l de ADN Normal + 30 μ l de ADN de Síndrome de Down

Se arreglaron tres reacciones de PCR separadas para el template de ADN normal y el template de ADN del individuo con Síndrome de Down. Asimismo, se arreglaron tres reacciones de PCR separadas para cada mezcla.

Diseño de las Plantillas

El SNP TSC0108992 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' CTACTGAGGGCTCGTAGATCCCAATTCCTTCCCAAGCT 3' (SEC ID No: 293)

Segunda plantilla:

5' AATCCTGCTTTAGGGACCATGCTGGTGGGA 3' (SEC ID No: 294)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC0108992 se amplió del template de ADN genómico usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR, Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202, incorporadas a este como referencia).

Para especificidad aumentada se usó una PCR de "inicio caliente". Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el Kit HotStarTaq Master Mix suministrado por QIAGEN (número de catálogo 203443). La cantidad de template de ADN y de plantilla por reacción se puede optimizar para cada sitio de interés, pero en este ejemplo se usaron 50 ng de template de ADN genómico humano y 5 µl de cada primer. Se realizaron treinta y ocho ciclos de PCR. Se usaron las siguientes condiciones de PCR:

- (1) 95°C por 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C por 30 segundos;
- (3) 95°C por 30 segundos;
- (4) 57°C por 30 segundos;
- (5) 95°C por 30 segundos;
- (6) 64°C por 30 segundos;
- (7) 95°C por 30 segundos;
- (8) Repite pasos 6 y 7 treinta y siete (37) veces;
- (9) 72°C por 5 minutos;

En el primer ciclo de PCR la temperatura de recocido estaba cerca de la temperatura de fusión de la región de recocido 3' de las segundas

plantillas, que fue de 37°C. La temperatura de recocido en el segundo ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recoce al templete de ADN de la primera plantilla, que fue de 57°C. La temperatura de recocido del tercer ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla, que fue de 64°C. La temperatura de recocido para los ciclos restantes fue de 64°C. La escalación de la temperatura de recocido de TM1 a TM2 a TM3 en los tres primeros ciclos de PCR mejora la especificidad grandemente. Estas temperaturas de recocido son representativas, y el experto entenderá que las temperaturas de recocido de cada ciclo dependen de las plantillas específicas usadas.

Las temperaturas y tiempos para la desnaturalización, recocido y extensión se pueden optimizar probando varios ajustes y usando los parámetros que produjeron los mejores resultados.

Purificación del Fragmento de Interés

Los productos de PCR fueron separados del templete de ADN genómico. Cada producto de reacción de PCR fue dividido en dos muestras y transferido en dos agujeros separados de una placa Streptawell transparente de Alto Enlace de Roche Diagnostics GmbH (número de catálogo 1 645 692, como se lista en Roche Molecular Biochemicals, Catálogo de Bioquímicos 2001). Para cada reacción de PCR hubo dos réplicas; cada una en un agujero separado de la placa microtituladora. La primera plantilla contenía un marcador de biotina 5' de forma que los productos de PCR se enlazaron a los agujeros recubiertos de Estreptavidina, mientras que el templete de ADN genómico no lo hizo. La reacción de ligamiento de estreptavidina se realizó usando un Termomezclador (Eppendorf) a 1000 rpm por 20 min., a 37°C. Cada agujero fue aspirado para remover el material no enlazado, y fue lavado tres veces con PBS 1X, con cuidadoso mezclado (Kandpal et al., Nucl. Acid Res. 18:1789-1795 (1990)); Kaneoka et al., Biotechniques 10:30-34 (1991); Green et al., Nucleic Acids Res. 18:6163-6164 (1990)).

Digestión de la enzima de restricción de los fragmentos aislados

Los productos de PCR purificados fueron digeridos con la enzima de restricción BsmF I, que se enlaza al sitio de reconocimiento incorporado en los productos de PCR de la segunda plantilla. Las digestiones fueron realizadas en los streptawells, siguiendo las instrucciones suministradas con la enzima de restricción. Después de la digestión, los agujeros fueron lavados tres veces con PBS 1X para remover los fragmentos clivados.

Incorporación del Nucleótido Marcado

La digestión de la enzima de restricción con BsmF I produjo un fragmento de ADN con una proyección 5', que contenía el sitio SNP o sitio de interés, y un extremo 3' suspendido. La proyección 5' funcionó como un template que permitía la incorporación de un nucleótido o nucleótidos en presencia de una polimerasa de ADN.

Como se discutió en detalle en el Ejemplo 6, la secuencia de ambos alelos de un SNP se puede determinar con un nucleótido marcado, en presencia de otros nucleótidos no marcados. Se agregaron los siguientes componentes a cada reacción de llenado: 1 μ l de ddTTP marcado fluorescentemente, 0.5 μ l de ddNTPs no marcados (40 μ M), que contenían todos los nucleótidos excepto timidina, 2 μ l de buffer de secuenasa 10X, 0.25 μ l de Secuenasa, y agua según se necesite para una reacción de 20 μ l. La reacción de llenado se realizó a 40°C por 10 min. El ddNTP marcado no-fluorescentemente se compró en Fermentas Inc. (Hanover, MD). Todos los otros reactivos de marcado se obtuvieron en Amersham (Kit Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Core, US 79565).

Después del marcado, cada streptawell fue lavado con PBS 1X (100 μ l) tres veces. Los fragmentos de ADN "llenados" fueron luego liberados de los streptawell mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI, según las instrucciones del fabricante que fueron suministradas con la enzima. La digestión se realizó por 1 hora a 37°C con agitación a 120 rpm.

Detección del Sitio de interés

Las muestras fueron cargadas en una línea de un gel de acrilamida al 5% (urea) de 36 cm (Bio Whittaker Molecular Applications, Long Ranger Run Gel Packs, número de catálogo 50691). Las muestras se sometieron a electroforesis en el gel a 3000 voltios por 3 min. El gel se corrió por 3 horas en un aparato de secuenciamiento (Hoefer SQ3 Sequencer). El gel fue removido del aparato y fue rastreado en el Typhoon 9400 Variable Mode Imager. El nucleótido marcado incorporado fue detectado mediante fluorescencia. Se extrajo una caja alrededor de cada banda, y la intensidad de la banda se calculó usando el software de Typhoon 9400 Variable Mode Imager.

Como se muestra en las FIGS. 17 A-F, se vieron dos bandas. La banda de peso molecular más bajo correspondía a las moléculas de ADN llenadas con ddTTP en la posición uno complementaria a la proyección. La banda de peso molecular más alto correspondía a las moléculas de ADN llenadas con ddTTP en la posición 3 complementaria a la proyección.

El experimento se realizó de manera ciega. Los tubos fueron codificados de forma que no se sabía que tubo correspondía a que template de ADN. Después de analizar los geles, cada tubo fue agrupado en las siguientes categorías: template de ADN normal, template de ADN de Síndrome de Down, mezcla de template de ADN de Síndrome de Down a ADN normal 3:1, mezcla de template de ADN normal a template de ADN de Síndrome de Down 1:1, mezcla de template de ADN de Síndrome de Down a template de ADN normal 1:2.3 y mezcla de template de ADN de Síndrome de Down a template de ADN normal 1:4. Cada réplica de cada reacción de PCR se agrupó exitosamente en la categoría apropiada, lo que demostró que el método se puede usar para detectar ADN anormal incluso si este representa solo un pequeño porcentaje del ADN total.

El porcentaje de alelo 2 a alelo 1 para cada réplica de las tres reacciones de PCR del template de ADN normal se muestran en la Tabla XVIII (ver también FIG. 17A). El porcentaje promedio de alelo 2 a alelo 1 se calculó dividiendo el valor de alelo 2 entre la suma de los valores de alelo 1 y alelo 2 ($\text{alelo 2}/(\text{alelo 1} + \text{alelo 2})$), que produjo un promedio de 0.50025 con una desviación estándar de 0.0002897. Así, el alelo 1 y el alelo 2 estaban presentes en una relación 50:50. Aunque que la intensidad varió de una

reacción de PCR a otra (comparar reacción 1 con reacción 3), no hubo diferencia de intensidad entre una reacción de PCR. Además, los valores obtenidos para las dos réplicas de las reacciones de PCR fueron muy similares. La mayoría de las variaciones estuvieron entre las variaciones de PCR y se atribuye probablemente a errores de pipeteado.

El porcentaje de alelo 2 a alelo 1 para cada réplica de las tres reacciones de PCR del template de ADN del Síndrome de Down se muestran en la Tabla XVIII (ver FIG. 17B). El porcentaje de alelo 2 a alelo 1 se calculó dividiendo el valor de alelo 2 entre la suma de los valores de alelo 1 y alelo 2 ($\text{alelo 2}/(\text{alelo 1} + \text{alelo 2})$), que produjo un promedio de 0.301314 con una desviación estándar de 0.012917. Es claro que incluso al analizar el gel a simple vista que el alelo 1 está presente en un número de copias mayor que el alelo 2 (ver FIG. 17B). De nuevo la mayoría de la variación ocurrió entre las reacciones de PCR y no entre la réplica de una reacción de PCR. La mayoría de las variaciones estuvieron entre las variaciones de PCR y se atribuye probablemente a errores de pipeteado.

El análisis de un SNP simple fue suficiente para detectar la presencia de la anomalía cromosómica. Un SNP es suficiente siempre y cuando el valor "p" del SNP sea conocido, y que haya un número adecuado de genomas de forma que no se introduzca el error estadístico en el análisis. En este experimento, hubo aproximadamente 5,000 genomas en cada reacción.

La reacción que consistió en una mezcla de template de ADN de Síndrome de Down y template de ADN normal en una relación 3:1 se distinguió claramente del template de ADN normal y las otras mezclas de ADN (ver FIG. 17C). El porcentaje calculado de alelo 2 a alelo 1 fue de 0.319089 con una desviación estándar de 0.004346 (ver Tabla XVIII). Asimismo, las reacciones que consistieron de una mezcla de template de ADN de Síndrome de Down a template de ADN normal en relaciones 1:1 y 1:2.3 se distinguían (ver FIG. 17D y 17E), y los valores fueron estadísticamente significativos de las otras relaciones (ver tabla XVIII).

Como la cantidad de template de ADN normal aumentó, el porcentaje de alelo 2 a alelo 1 aumentó. Con una mezcla de template de ADN de

Síndrome de Down y template de ADN normal de 1:4, el el porcentaje de alelo 2 a alelo 1 fue de 0.397642, con una desviación estándar de 0.001903 (ver FIG. 17F). La diferencia entre este valor y el valor obtenido del template de ADN normal es estadísticamente significativa. Así, los métodos descritos aquí permiten la detección de una anomalía cromosómica incluso cuando la muestra no es una muestra homogénea de ADN anormal.

Como se describió anteriormente, se puede detectar la presencia de una pequeña fracción de ADN con número anormal de copias de cromosomas incluso entre una gran presencia de ADN normal. Fue claro, incluso a simple vista, que como la cantidad de ADN normal aumentó y la cantidad de ADN con síndrome de Down disminuyó, las intensidades de las bandas que correspondían a los alelos 1 y 2 se igualó.

Los ejemplos anteriores analizaron un SNP localizado en el cromosoma 21. Sin embargo, se puede analizar cualquier cromosoma incluyendo, sin limitarse a cromosomas humanos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X y Y, y los cromosomas fetales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X y Y. Además, se pueden analizar los cromosomas de organismos no-humanos usando los métodos anteriores. Se puede analizar cualquier combinación de cromosomas. En el ejemplo anterior se detectó una copia extra de un cromosoma. Sin embargo, se pueden usar los mismos métodos para detectar monosomías.

TABLA XVIII. Porcentaje de alelo 2 a alelo 1 en SNP TSC0108992 usando template de ADN normal y template de ADN de Síndrome de Down.

	Template de ADN Normal		
	Alelo 1	Alelo 2	2/(2+1)
1A	2602115	2604525	0.500231
1B	2855846	2923860	0.505884
2A	1954765	1941929	0.498353
2B	2084476	2068106	0.498029
3A	2044147	2035719	0.498967
3B	1760291	1760543	0.500036

		Media	0.50025
		Desv. Std.	0.002897
		Síndrome de Down	
	Alelo 1	Alelo 2	2/(2+1)
1A	4046926	1595581	0.282779
1B	4275341	1736260	0.288818
2A	2875698	1299509	0.311244
2B	2453615	1069635	0.303593
3A	3169338	1426643	0.310411
3B	3737440	1687286	0.311036
		Media	0.301314
		Desv. Std.	0.012917
		3:1 (Down: Normal)	
	Alelo 1	Alelo 2	2/(2+1)
1A	4067623	1980770	0.327487
1B	4058508	1899853	0.318855
2A	2315044	1085860	0.319286
2B	2686984	1243406	0.316357
3A	3880385	1790764	0.315767
3B	371861	1724189	0.316781
		Media	0.319089
		Desv. Std.	0.004346
		1:1 (Down: Normal)	
	Alelo 1	Alelo 2	2/(2+1)
1A	3540255	1929840	0.352798
1B	4004085	2161443	0.350569
2A	2358009	1282132	0.35222
2B	2158132	1238377	0.364603
3A	2052330	1648677	0.350707

3B	3852682	2024012	0.344413
		Media	0.352552
		Desv. Std.	0.006618
		1:2.3 (Down: Normal)	
	Alelo 1	Alelo 2	2/(2+1)
1A	3109326	1942597	0.384526
1B	3392477	2118011	0.38436
2A	2824213	1758428	0.383715
2B	2069889	1249545	0.376433
3A	2335128	1433016	0.380298
3B	2916772	1797965	0.38135
		Media	0.38178
		Desv. Std.	0.003128
		1:4 (Down: Normal)	
	Alelo 1	Alelo 2	2/(2+1)
1A	3066524	2069636	0.399446
1B	3068284	2038770	0.399207
2A	2325477	1542526	0.398791
2B	2366122	1562218	0.397679
3A	2151205	1403120	0.394764
3B	2397046	1571360	0.395968
		Media	0.397642
		Desv. Std.	0.001903

EJEMPLO 12

Como se discutió en el Ejemplo 9 anterior, la relación de aelo 1 a alelo 2 en un SNP heterocigótico es constante. Sin embargo, un factor que puede influenciar la relación de alelo 1 a alelo 2 en un SNP heterocigótico es un bajo número de genomas. Por ejemplo, si hay 40 genomas, que significa

que hay un total de 40 cromosomas del alelo 1 y 40 cromosomas del alelo 2, es estadísticamente posible que las plantillas se puedan reconocer a 40 de los cromosomas con el alelo 1, pero solamente a 30 de los cromosomas del alelo 2. Esto afectará la relación de alelo 1 a alelo 2, y puede influenciar erróneamente el valor "p" para un SNP particular.

Típicamente, la amplificación genómica entera, que emplea PCR de oligonucleótido degenerado, se usa para aumentar las bajas cantidades de muestras de ADN genómico. Se usan oligonucleótidos de 8, 10, 12 o 14 bases para amplificar el genoma. Se piensa que las plantillas se reconocen aleatoriamente a través del genoma, y amplificarán una pequeña muestra de ADN genómico en cientos de veces más ADN para el análisis genético.

Los métodos descritos aquí aprovechan el hecho que, típicamente el genoma entero no es de interés. Sitios particulares de interés localizados en un cromosoma, o en múltiples cromosomas, o en cromosomas que representan el genoma entero son seleccionados para análisis. Incluso si los sitios de interés están localizados en los cromosomas del genoma entero, se prefiere amplificar la región de los cromosomas que contienen los sitios de interés.

Para superar el límite de un bajo número de genomas, que usualmente se ve con el ADN obtenido del plasma de una hembra embarazada, se puede usar un método multiplex para aumentar el número de genomas. El método descrito a continuación amplía preferencialmente el cromosoma o cromosomas que contiene los sitios de interés.

Preparación del Template de ADN

Se recolectó una muestra de 9 ml de sangre en un tubo estéril de un voluntario humano después de haber dado su consentimiento. (Fisher Scientific, tubos Vacuette con 9 ml de EDTA, número de catálogo NC9897284). Los tubos fueron agitados a 1000 rpm por diez minutos. El sobrenadante (el plasma) de cada muestra fue removido, y un mililitro de la muestra de sangre restante, que se refiere comúnmente como la "cubierta amarilla" se transfirió a un nuevo tubo. Se agregó un mililitro de PBS 1X a

cada muestra. El template de ADN se aisló usando el Kit QIAmp ADN Blood Midi suministrado por QIAGEN (número de catálogo 51183).

Diseño de las Plantillas Multiplex

Las plantillas fueron diseñadas para que se cocieran en diferentes regiones del cromosoma 21 para aumentar el número de copias de los sitios de interés localizados en el cromosoma 21. Las plantillas eran de 12 bases de longitud. Sin embargo, se pueden usar plantillas de cualquier longitud que incluyen, pero sin limitarse a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36-45, 46-55, 56-65, 66-75, 76-85, 86-95, 96-105, 106-115, 116-125, y más de 125 bases. Las plantillas fueron diseñadas para recocerse tanto en la dirección de la cadena como en la dirección contraria de la cadena.

Se analizaron nueve SNPs localizados en el cromosoma 21: TSC0397235, TSC 0470003, TSC1649726, TSC1261039, TSC0310507, TSC1650432, TSC1335008, TSC0128307 y TSC0259757. Se puede analizar cualquier número de SNPs incluyendo, pero sin limitarse a 1-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90, 91-100, 101-200, 201-300, 301-400, 401-500, 501-600, 601-700, 701-800, 801-900, 901-1000, 1001-2000, 3001-3000, 3001-4000, 4001-5000, 5001-6000, 6001-7000, 7001-8000, 8001-9000, 9001-10,000 y más de 10,000.

Para cada uno de los 9 SNPs se diseñó una plantilla de 12 bases para recocerse a aproximadamente 1340 bases aguas arriba de los sitios de interés, y se diseñó una plantilla de 12 bases para recocerse a aproximadamente 130 bases aguas abajo de los sitios de interés (referidas aquí como las plantillas multiplex). Las plantillas multiplex se pueden diseñar para recocerse a cualquier distancia del los sitios de interés incluyendo, pero sin limitarse a 10-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90, 91-100, 101-110, 111-120, 121-130, 131-140, 141-150, 151-160, 161-170, 171-180, 181-190, 191-200, 201-210, 211-220, 221-230, 231-240, 241-250, 251-260, 261-270, 271-280, 281-290, 291-300, 301-310, 311-320, 321-330, 331-340, 341-350, 351-360, 361-370, 371-380, 381-390, 391-400, 401-410, 411-420, 421-430, 431-440, 441-450, 451-460, 461-470, 471-480, 481-490, 491-500, 501-600, 601-700, 701-800, 801-900, 901-1000, 1001-

2000, 2001-3000, 3001-4000, 4001-5000, y más de 5000 bases. Adicionalmente, se puede usar más de un juego de plantillas multiplex para un SNP incluyendo, pero sin limitarse a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 21-30, 31-40, 41-50, y más de 50.

Además, se usaron 91 juegos de plantillas delantera y reversa para amplificar otras regiones del cromosoma 21, para un total de 100 juegos de plantillas (200 plantillas en la reacción). Estos 91 juegos de plantillas se usaron para demostrar que se puede usar un gran número de plantillas en una reacción simple sin producir un gran número de bandas no específicas. Se puede usar cualquier número de plantillas en la reacción incluyendo, pero sin limitarse a 1-10, 11-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90, 91-100, 101-200, 201-300, 301-400, 401-500, 501-600, 601-700, 701-800, 801-900, 901-1000, 1001-2000, 2001-3000, 3001-4000, 4001-5000, 5001-6000, 6001-7000, 7001-8000, 8001-9000, 9001-10,000, 10,001-20,000, 20,000-30,000 y más de 30,000.

Las plantillas multiplex fueron diseñadas para tener los mismos nucleótidos en el extremo 3' de la plantilla. En este caso, las plantillas multiplex terminaron en "AA", en donde A indica Adenina. Las plantillas fueron diseñadas de esta forma para minimizar la formación de dimerización de plantilla. Sin embargo, Las plantillas pueden terminar en cualquier nucleótido incluyendo, pero sin limitarse a adenina, guanina, citosina, timidina, cualquier combinación de adenina y guanina, cualquier combinación de adenina y citosina, cualquier combinación de adenina y timidina, cualquier combinación de guanina y citosina, cualquier combinación de guanina y timidina, o cualquier combinación de citosina y timidina. Además, las plantillas multiplex pueden tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más de 10 de los mismos nucleótidos en el extremo 3'.

Las plantillas multiplex para SNP TSC0397235 fueron:

Plantilla Delantera:

5' CAAGTGTCTCTAA 3' (SEC ID No: 295)

Plantilla reversa:

5' CAGCTGCTAGAA 3' (SEC ID No: 296)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0470003 fueron:

Plantilla Delantera:

5' GGTTGAGGGCAA 3' (SEC ID No: 297)

Plantilla reversa:

5' CACAGCGGGTAA 3' (SEC ID No: 298)

Las plantillas multiplex para SNP TSC1649726 fueron:

Plantilla Delantera:

5' TTGACTTTTAA 3' (SEC ID No: 299)

Plantilla reversa:

5' ACAGAATGGGAA 3' (SEC ID No: 300)

Las plantillas multiplex para SNP TSC1261039 fueron:

Plantilla Delantera:

5' TGCAGGTCACAA 3' (SEC ID No: 301)

Plantilla reversa:

5' TTCTTCTTATAA 3' (SEC ID No: 302)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0310507 fueron:

Plantilla Delantera:

5' AGGACAACCTAA 3' (SEC ID No: 303)

Plantilla reversa:

5' TGGTGTTTCAGAA 3' (SEC ID No: 304)

Las plantillas multiplex para SNP TSC1650432 fueron:

Plantilla Delantera:

5' TCAGCATATGAA 3' (SEC ID No: 305)

Plantilla reversa:

5' GTTGCCACACAA 3' (SEC ID No: 306)

Las plantillas multiplex para SNP TSC1335008 fueron:

Plantilla Delantera:

5' CCCAGCTAGCAA 3' (SEC ID No: 307)

Plantilla reversa:

5' GGGTCACTGTAA 3' (SEC ID No: 308)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0128307 fueron:

Plantilla Delantera:

5' TTAAATACCCAA 3' (SEC ID No: 309)

Plantilla reversa:

5' TTAGGAGGTAA 3' (SEC ID No: 310)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0259757 fueron:

Plantilla Delantera:

5' ACACAGAATCAA 3' (SEC ID No: 311)

Plantilla reversa:

5' CGCTGAGGTCAA 3' (SEC ID No: 312)

Se incluyeron noventa y un (91) juegos adicionales de plantillas que se cocieron a las diferentes regiones a lo largo del cromosoma 21:

Juego 1:

Plantilla Delantera:

5' AAGTAGAGTCAA 3' (SEC ID No: 313)

Plantilla reversa:

5' CTTCCCATGGAA 3' (SEC ID No: 314)

Juego 2:

Plantilla Delantera:

5' TTGGTTATTAAA 3' (SEC ID No: 315)

Plantilla reversa:

5' CAACTTACTGAA 3' (SEC ID No: 316)

Juego 3:

Plantilla Delantera:

5' CACTAAGTGAAA 3' (SEC ID No: 317)

Plantilla reversa:

5' CTCACCTGCCAA 3' (SEC ID No: 318)

Juego 4:

Plantilla Delantera:

5' ATGCATATATAA 3' (SEC ID No: 319)

Plantilla reversa:

5' AGAGATCAGCAA 3' (SEC ID No: 320)

Juego 5:

Plantilla Delantera:

5' TATATTTTCAA 3' (SEC ID No: 321)

Plantilla reversa:

5' CAGAAAGCAGAA 3' (SEC ID No: 322)

Juego 6:

Plantilla Delantera:

5' GTATTGGGTAA 3' (SEC ID No: 323)

Plantilla reversa:

5' CTGACCCAGGAA 3' (SEC ID No: 324)

Juego 7:

Plantilla Delantera:

5' CAGTTTTCCCAA 3' (SEC ID No: 325)

Plantilla reversa:

5' AGGGCACAGGAA 3' (SEC ID No: 326)

Juego 8:

Plantilla Delantera:

5' GTATCAGAGGAA 3' (SEC ID No: 327)

Plantilla reversa:

5' GCATGAAAAGAA 3' (SEC ID No: 328)

Juego 9:

Plantilla Delantera:

5' GATTTGACAGAA 3' (SEC ID No: 329)

Plantilla reversa:

5' TACAGTTTACAA 3' (SEC ID No: 330)

Juego 10:

Plantilla Delantera:

5' TGTGATTTTAA 3' (SEC ID No: 331)

Plantilla reversa:

5' TTATGTTCTCAA 3' (SEC ID No: 332)

Juego 11:

Plantilla Delantera:

5' CAAGTACTTGAA 3' (SEC ID No: 333)

Plantilla reversa:

5' CTTGTGTGGCAA 3' (SEC ID No: 334)

Juego 12:

Plantilla Delantera:

5' AGACTTCTGCAA 3' (SEC ID No: 335)

Plantilla reversa:

5' GTTGTCTTTCAA 3' (SEC ID No: 336)

Juego 13:

Plantilla Delantera:

5' GGGACACTCCAA 3' (SEC ID No: 337)

Plantilla reversa:

5' ATTATTATTCAA 3' (SEC ID No: 338)

Juego 14:

Plantilla Delantera:

5' ACATGATGACAA 3' (SEC ID No: 339)

Plantilla reversa:

5' TCAATTATAGAA 3' (SEC ID No: 340)

Juego 15:

Plantilla Delantera:

5' CTATGGGCTGAA 3' (SEC ID No: 341)

Plantilla reversa:

5' TGTGTGCCTGAA 3' (SEC ID No: 342)

Juego 16:

Plantilla Delantera:

5' CCATTTGTTGAA 3' (SEC ID No: 343)

Plantilla reversa:

5' TCTCCATCAAAA 3' (SEC ID No: 344)

Juego 17:

Plantilla Delantera:

5' AATGCTGACAAA 3' (SEC ID No: 345)

Plantilla reversa:

5' TTTCATGTCCAA 3' (SEC ID No: 346)

Juego 18:

Plantilla Delantera:

5' GGCCTCTTGAA 3' (SEC ID No: 347)

Plantilla reversa:

5' TCATTTTTTGAA 3' (SEC ID No: 348)

Juego 19:

Plantilla Delantera:

5' GGACTACCATAA 3' (SEC ID No: 349)

Plantilla reversa:

5' AGTCACTCAGAA 3' (SEC ID No: 350)

Juego 20:

Plantilla Delantera:

5' CCTTGGCAGGAA 3' (SEC ID No: 351)

Plantilla reversa:

5' TTTCTGGTAGAA 3' (SEC ID No: 352)

Juego 21:

Plantilla Delantera:

5' CCCCCCCCCGAA 3' (SEC ID No: 353)

Plantilla reversa:

5' GCCCAGGCAGAA 3' (SEC ID No: 354)

Juego 22:

Plantilla Delantera:

5' GAATGCGAAGAA 3' (SEC ID No: 355)

Plantilla reversa:

5' TTAGGTAGAGAA 3' (SEC ID No: 356)

Juego 23:

Plantilla Delantera:

5' TGATTTGGTCAA 3' (SEC ID No: 357)

Plantilla reversa:

5' GCCCATTAATAA 3' (SEC ID No: 358)

Juego 24:

Plantilla Delantera:

5' TGAGATCTTTAA 3' (SEC ID No: 359)

Plantilla reversa:

5' CAGTTTGTTCOA 3' (SEC ID No: 360)

Juego 25:

Plantilla Delantera:

5' GCTGGGCAAGAA 3' (SEC ID No: 361)

Plantilla reversa:

5' AGTCAAAGTCAA 3' (SEC ID No: 362)

Juego 26:

Plantilla Delantera:

5' TCTCTGCAGTAA 3' (SEC ID No: 363)

Plantilla reversa:

5' TGAATAACTTAA 3' (SEC ID No: 364)

Juego 27:

Plantilla Delantera:

5' CGGTTAGAAAAA 3' (SEC ID No: 365)

Plantilla reversa:

5' CATCCCTTTCAA 3' (SEC ID No: 366)

Juego 28:

Plantilla Delantera:

5' TCTCTTTCTGAA 3' (SEC ID No: 367)

Plantilla reversa:

5' CTCAGATTGTAA 3' (SEC ID No: 368)

Juego 29:

Plantilla Delantera:

5' TTTGCACCAGAA 3' (SEC ID No: 369)

Plantilla reversa:

5' GGTTAACATGAA 3' (SEC ID No: 370)

Juego 30:

Plantilla Delantera:

5' ATTATCAACTAA 3' (SEC ID No: 371)

Plantilla reversa:

5' GCCATTTTGTA 3' (SEC ID No: 372)

Juego 31:

Plantilla Delantera:

5' GATCTAGATGAA 3' (SEC ID No: 373)

Plantilla reversa:

5' TTAATGTATTAA 3' (SEC ID No: 374)

Juego 32:

Plantilla Delantera:

5' CTAGGGAGACAA 3' (SEC ID No: 375)

Plantilla reversa:

5' TGGAGGAGACAA 3' (SEC ID No: 376)

Juego 33:

Plantilla Delantera:

5' CATCACATTTAA 3' (SEC ID No: 377)

Plantilla reversa:

5' GGGGTCCTGCAA 3' (SEC ID No: 378)

Juego 34:

Plantilla Delantera:

5' CAGTTGTGCTAA 3' (SEC ID No: 379)

Plantilla reversa:

5' TCTGCAGCCTAA 3' (SEC ID No: 380)

Juego 35:

Plantilla Delantera:

5' GAGTCATTTAAA 3' (SEC ID No: 381)

Plantilla reversa:

5' TCTATGGATTAA 3' (SEC ID No: 382)

Juego 36:

Plantilla Delantera:

5' CAAAAAGTAGAA 3' (SEC ID No: 383)

Plantilla reversa:

5' AATATACTCCAA 3' (SEC ID No: 384)

Juego 37:

Plantilla Delantera:

5' CGTCCAGCACAA 3' (SEC ID No: 385)

Plantilla reversa:

5' GGATGGTGAGAA 3' (SEC ID No: 386)

Juego 38:

Plantilla Delantera:

5' TCTCCTTTGTAA 3' (SEC ID No: 387)

Plantilla reversa:

5' TCGTTATTTCAA 3' (SEC ID No: 388)

Juego 39:

Plantilla Delantera:

5' GATTTTATAGAA 3' (SEC ID No: 389)

Plantilla reversa:

5' AGACATAAGCAA 3' (SEC ID No: 390)

Juego 40:

Plantilla Delantera:

5' TTCACCTCACAA 3' (SEC ID No: 391)

Plantilla reversa:

5' GGATTGCTTGAA 3' (SEC ID No: 392)

Juego 41:

Plantilla Delantera:

5' ACTGCATGTGAA 3' (SEC ID No: 393)

Plantilla reversa:

5' TTTATCACAGAA 3' (SEC ID No: 394)

Juego 42:

Plantilla Delantera:

5' TCAGTAACACAA 3' (SEC ID No: 395)

Plantilla reversa:

5' TACATCTTTGAA 3' (SEC ID No: 396)

Juego 43:

Plantilla Delantera:

5' TTGTTTCAGTAA 3' (SEC ID No: 397)

Plantilla reversa:

5' TATGAGCATCAA 3' (SEC ID No: 398)

Juego 44:

Plantilla Delantera:

5' CTCAGCAGGCAA 3' (SEC ID No: 399)

Plantilla reversa:

5' ACCCCTGTATAA 3' (SEC ID No: 400)

Juego 45:

Plantilla Delantera:

5' TCTGCTCAGCAA 3' (SEC ID No: 401)

Plantilla reversa:

5' GTTCTTTTTTAA 3' (SEC ID No: 402)

Juego 46:

Plantilla Delantera:

5' GTGATAATCCAA 3' (SEC ID No: 403)

Plantilla reversa:

5' GAGCCCTCAGAA 3' (SEC ID No: 404)

Juego 47:

Plantilla Delantera:

5' TTTATTGGTTAA 3' (SEC ID No: 405)

Plantilla reversa:

5' GGTACTGGGCAA 3' (SEC ID No: 406)

Juego 48:

Plantilla Delantera:

5' AGTGTTTTTCAA 3' (SEC ID No: 407)

Plantilla reversa:

5' TGTTATTGGTAA 3' (SEC ID No: 408)

Juego 49:

Plantilla Delantera:

5' GCGCATTCACAA 3' (SEC ID No: 409)

Plantilla reversa:

5' AAACAAAAGCAA 3' (SEC ID No: 410)

Juego 50:

Plantilla Delantera:

5' TATATGATAGAA 3' (SEC ID No: 411)

Plantilla reversa:

5' TCCCAGTTCCAA 3' (SEC ID No: 412)

Juego 51:

Plantilla Delantera:

5' AAAGCCCATAAA 3' (SEC ID No: 413)

Plantilla reversa:

5' TGTCATCCACAA 3' (SEC ID No: 414)

Juego 52:

Plantilla Delantera:

5' TTGTGAATGCAA 3' (SEC ID No: 415)

Plantilla reversa:

5' GTATTCATACAA 3' (SEC ID No: 416)

Juego 53:

Plantilla Delantera:

5' TGACATAGGGAA 3' (SEC ID No: 417)

Plantilla reversa:

5' AGCAAATTGCAA 3' (SEC ID No: 418)

Juego 54:

Plantilla Delantera:

5' AGTAGATGTTAA 3' (SEC ID No: 419)

Plantilla reversa:

5' AAAAGATAATAA 3' (SEC ID No: 420)

Juego 55:

Plantilla Delantera:

5' ACCTCATGGGAA 3' (SEC ID No: 421)

Plantilla reversa:

5' TGGTCGACCTAA 3' (SEC ID No: 422)

Juego 56:

Plantilla Delantera:

5' TTTGCATGGTAA 3' (SEC ID No: 423)

Plantilla reversa:

5' GCGGCTGCCGAA 3' (SEC ID No: 424)

Juego 57:

Plantilla Delantera:

5' TCAGGAGTCTAA 3' (SEC ID No: 425)

Plantilla reversa:

5' GCCTACCAGGAA 3' (SEC ID No: 426)

Juego 58:

Plantilla Delantera:

5' ATCTTCTGTTAA 3' (SEC ID No: 427)

Plantilla reversa:

5' AGGTAAGGACAA 3' (SEC ID No: 428)

Juego 59:

Plantilla Delantera:

5' TGCTTTGAGGAA 3' (SEC ID No: 429)

Plantilla reversa:

5' AACAGTTTTAAA 3' (SEC ID No: 430)

Juego 60:

Plantilla Delantera:

5' TTAAATGTTTAA 3' (SEC ID No: 431)

Plantilla reversa:

5' ATAGAAAATCAA 3' (SEC ID No: 432)

Juego 61:

Plantilla Delantera:

5' GTGTTGTGTTAA 3' (SEC ID No: 433)

Plantilla reversa:

5' GAGGACCTCGAA 3' (SEC ID No: 434)

Juego 62:

Plantilla Delantera:

5' AGAGGCTGAGAA 3' (SEC ID No: 435)

Plantilla reversa:

5' GGTATTTATTAA 3' (SEC ID No: 436)

Juego 63:

Plantilla Delantera:

5' ATTTATCTGGAA 3' (SEC ID No: 437)

Plantilla reversa:

5' AGTGCAAACCTAA 3' (SEC ID No: 438)

Juego 64:

Plantilla Delantera:

5' TGAACACCTTAA 3' (SEC ID No: 439)

Plantilla reversa:

5' AATTTTTTCTAA 3' (SEC ID No: 440)

Juego 65:

Plantilla Delantera:

5' TTACTATTATAA 3' (SEC ID No: 441)

Plantilla reversa:

5' TGCTATAGTGAA 3' (SEC ID No: 442)

Juego 66:

Plantilla Delantera:

5' TGGACTATGGAA 3' (SEC ID No: 443)

Plantilla reversa:

5' CTGCAGTCCGAA 3' (SEC ID No: 444)

Juego 67:

Plantilla Delantera:

5' GCTACTGCCCAA 3' (SEC ID No: 445)

Plantilla reversa:

5' TCACATGGTGAA 3' (SEC ID No: 446)

Juego 68:

Plantilla Delantera:

5' GTGGCTCTGGAA 3' (SEC ID No: 447)

Plantilla reversa:

5' GAATTCCATTAA 3' (SEC ID No: 448)

Juego 69:

Plantilla Delantera:

5' TGGGGTGTCCAA 3' (SEC ID No: 449)

Plantilla reversa:

5' GCAAGCTCCGAA 3' (SEC ID No: 450)

Juego 70:

Plantilla Delantera:

5' ATGTTTTTTCAA 3' (SEC ID No: 451)

Plantilla reversa:

5' AGATCTGTTGAA 3' (SEC ID No: 452)

Juego 71:

Plantilla Delantera:

5' AAGTGCTGTGAA 3' (SEC ID No: 453)

Plantilla reversa:

5' ACTTTTTTGGAA 3' (SEC ID No: 454)

Juego 72:

Plantilla Delantera:

5' AATCGGCAGGAA 3' (SEC ID No: 455)

Plantilla reversa:

5' GGCATGTCACAA 3' (SEC ID No: 456)

Juego 73:

Plantilla Delantera:

5' AGGAAGAAAGAA 3' (SEC ID No: 457)

Plantilla reversa:

5' CAGTTTCACCAA 3' (SEC ID No: 458)

Juego 74:

Plantilla Delantera:

5' CACAGAATTTAA 3' (SEC ID No: 459)

Plantilla reversa:

5' AAGAATAAGTAA 3' (SEC ID No: 460)

Juego 75:

Plantilla Delantera:

5' GGGATAGTACAA 3' (SEC ID No: 461)

Plantilla reversa:

5' TTCCCATGATAA 3' (SEC ID No: 462)

Juego 76:

Plantilla Delantera:

5' TGATTAGTTGAA 3' (SEC ID No: 463)

Plantilla reversa:

5' GCATTCAGTGAA 3' (SEC ID No: 464)

Juego 77:

Plantilla Delantera:

5' AGGGAATATTAA 3' (SEC ID No: 465)

Plantilla reversa:

5' GACCTTAGGTAA 3' (SEC ID No: 466)

Juego 78:

Plantilla Delantera:

5' TTCTTTTCACAA 3' (SEC ID No: 467)

Plantilla reversa:

5' CCAAATAAGAA 3' (SEC ID No: 468)

Juego 79:

Plantilla Delantera:

5' GTGCTCTTAGAA 3' (SEC ID No: 469)

Plantilla reversa:

5' ATGAGTTTAGAA 3' (SEC ID No: 470)

Juego 80:

Plantilla Delantera:

5' ATGAGCATAGAA 3' (SEC ID No: 471)

Plantilla reversa:

5' GACAAATGAGAA 3' (SEC ID No: 472)

Juego 81:

Plantilla Delantera:

5' AAACCCAGAGAA 3' (SEC ID No: 473)

Plantilla reversa:

5' CCTCACACAGAA 3' (SEC ID No: 474)

Juego 82:

Plantilla Delantera:

5' CACACTGTGGAA 3' (SEC ID No: 475)

Plantilla reversa:

5' CACTGTACCCAA 3' (SEC ID No: 476)

Juego 83:

Plantilla Delantera:

5' GTAGTATTTCAA 3' (SEC ID No: 477)

Plantilla reversa:

5' TGGATACACTAA 3' (SEC ID No: 478)

Juego 84:

Plantilla Delantera:

5' CCCATGATTCAA 3' (SEC ID No: 479)

Plantilla reversa:

5' TCATAGGAGGAA 3' (SEC ID No: 480)

Juego 85:

Plantilla Delantera:

5' AGGAAAGAGAAA 3' (SEC ID No: 481)

Plantilla reversa:

5' ATATGGTGATAA 3' (SEC ID No: 482)

Juego 86:

Plantilla Delantera:

5' GATGCCATCCAA 3' (SEC ID No: 483)

Plantilla reversa:

5' ATACTATTTCAA 3' (SEC ID No: 484)

Juego 87:

Plantilla Delantera:

5' GTGTGCATGGAA 3' (SEC ID No: 485)

Plantilla reversa:

5' AGGTGTTGAGAA 3' (SEC ID No: 486)

Juego 88:

Plantilla Delantera:

5' CAGCCTGGGCAA 3' (SEC ID No: 487)

Plantilla reversa:

5' GGAGCTCTACAA 3' (SEC ID No: 488)

Juego 89:

Plantilla Delantera:

5' AACTAAGGTAA 3' (SEC ID No: 489)

Plantilla reversa:

5' AACTTATGTAA 3' (SEC ID No: 490)

Juego 90:

Plantilla Delantera:

5' ATCTCAACAGAA 3' (SEC ID No: 491)

Plantilla reversa:

5' TAACAATGTGAA 3' (SEC ID No: 492)

Juego 91:

Plantilla Delantera:

5' AAGGATCAGGAA 3' (SEC ID No: 493)

Plantilla reversa:

5' CTCAAGTCTTAA 3' (SEC ID No: 494)

PCR Multiplex

Las regiones en el cromosoma 21 circundantes a los SNPs TSC0397235, TSC 0470003, TSC1649726, TSC1261039, TSC0310507, TSC1650432, TSC1335008, TSC0128307 y TSC0259757 fueron ampliadas del template de ADN genómico usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR, Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202, incorporadas a este como referencia). Esta reacción de PCR usó plantillas que se cocieron aproximadamente a 130 bases aguas arriba y aguas abajo de los sitios de interés. Se usó para aumentar el número de copias de los sitios de interés,

para eliminar cualquier error que pueda resultar por un bajo número de genomas.

Para especificidad aumentada se usó una reacción de PCR de "inicio caliente". Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el Kit HotStatTaq Master Mix suministrado por QIAGEN (número de catálogo 203443). La cantidad de template de ADN y plantilla por reacción se puede optimizar para cada sitio de interés. En este ejemplo se usaron 15 ng de template de ADN genómico humano y 5 μ M de cada plantilla.

Dos microlitros de cada plantilla delantera y reversa, a concentraciones de 5 mM se recolectaron en un tubo de microcentrífuga simple y se mezclaron. Se usaron ocho microlitros de la mezcla de plantilla en un volumen total de reacción PCR de 40 μ l (1.5 μ l de template de ADN, 10.5 μ l de agua estéril, 8 μ l de mezcla de plantilla, y 20 μ l de HotStart Taq). Se realizaron veinticinco ciclos de PCR. Se usaron las siguientes condiciones de PCR:

- (1) 95°C por 15 minutos;
- (2) 95°C por 30 segundos;
- (3) 4°C por 30 segundos;
- (4) 37°C por 30 segundos;
- (5) Repite pasos 2-4 veinticuatro (24) veces;
- (6) 72°C por 10 minutos;

Las temperaturas y tiempos para la desnaturalización, recocido y extensión se pueden optimizar probando varios ajustes y usando los parámetros que produjeron los mejores resultados.

Purificación del Fragmento de Interés

Las plantillas y nucleótidos en exceso fueron removidos de la reacción mediante el uso de los kits de purificación de PCR Quagen MinElute (Qiagen, Número de catálogo 28004). Las reacciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante suministradas con las columnas. El ADN fue eluido en 100 μ l de agua estéril.

Reacción Dos de PCR

El SNP TSC0397235 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' TTAGTCATCGCAGAATTCTACTTCTTTCTGAAGTGGGA 3' (SEC ID No: 495)

Segunda plantilla:

5' GGACAGCTCGATGGGACTAATGCATACTC 3' (SEC ID No: 486)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y fue diseñado para recocerse a 103 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC0470003 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' GTAGCCACTGGTGAATTCGTGCCATCGCAAAGAATAA 3' (SEC ID No: 497)

Segunda plantilla:

5' ATTAGAATGATGGGGACCCCTGTCTTCCC 3' (SEC ID No: 498)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y fue diseñado para recocerse a 80 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC1649726 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' ACGCATAGGAAGGAATTCATTCTGACACGTGTGAGATA 3' (SEC ID No: 499)

Segunda plantilla:

5' GAAATTGACCACGGGACTGCACACTTTTC 3' (SEC ID No: 500)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y fue diseñado para recocerse a 113 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC1261039 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' CGGTAAATCGGAGAATTCAAGTTGAGGCATGCATCCAT 3' (SEC ID No: 501)

Segunda plantilla:

5' TCGGGGCTCAGCGGGACCACAGCCACTCC 3' (SEC ID No: 502)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y fue diseñado para recocerse a 54 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC0310507 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' TCTATGCACCACGAATTCAATATGTGTTCAAGGACATT 3' (SEC ID No: 503)

Segunda plantilla:

5' TGCTTAATCGGTGGGACTTGTAATTGTAC 3' (SEC ID No: 504)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y fue diseñado para recocerse a 93 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC1650432 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' CGCGTTGTATGCGAATTCCCTGGGGTATAAAGATAAGA 3' (SEC ID No: 505)

Segunda plantilla:

5' CTCACGGGAACTGGGACACCTGACCCTGC 3' (SEC ID No: 506)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y fue diseñado para recocerse a 80 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC1335008 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' GTCTTGCCGCTTGAATTCCCATAGAAGAATGCGCCAAA 3' (SEC ID No: 507)

Segunda plantilla:

5' TTGAGTAGTACAGGGACACACTAACAGAC 3' (SEC ID No: 508)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y fue diseñado para recocerse a 94 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC0128307 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' AATACTGTAGGTGAATTCTTGCCTAAGCATTTTCCCAG 3' (SEC ID No: 509)

Segunda plantilla:

5' GTGTTGACATTCGGGACTGTAATCTTGAC 3' (SEC ID No: 510)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y fue diseñado para recocerse a 54 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

El SNP TSC0259757 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' TCTGTAGATTCGGAATTCTTTAGAGCCTGTGCGCTGAG 3' (SEC ID No: 511)

Segunda plantilla:

5' CGTACCAGTACAGGGACGCAAAGTCTGAGAC 3' (SEC ID No: 512)

La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y fue diseñado para recocerse a 100 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

Todos los sitios de interés fueron amplificados del template de ADN genómico usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR, Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202, incorporadas a este como referencia). En este ejemplo, los sitios de interés fueron amplificados en tubos de reacción separados, pero también se pudieron haber amplificado juntos en una reacción de PCR simple. Para especificidad aumentada se usó una PCR de "inicio caliente". Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el Kit HotStarTaq Master Mix suministrado por QIAGEN (número de catálogo 203443).

Se usó un microlitro del eluido de la reacción multiplex (producto de PCR eluido de la columna MinElute) como template de ADN para cada reacción de PCR. Cada SNP fue amplificado en triplicado de 15 ng del template de ADN original (ADN que no se sometió a la reacción multiplex). La cantidad de template de ADN y de plantillapor reacción se puede optimizar para cada sitio de interés pero en este ejemplo se usaron 5 µM de cada primer. Se realizaron cuarenta ciclos de PCR. Se usaron las siguientes condiciones de PCR:

- (1) 95°C por 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C por 30 segundos;
- (3) 95°C por 30 segundos;
- (4) 57°C por 30 segundos;
- (5) 95°C por 30 segundos;
- (6) 64°C por 30 segundos;

- (7) 95°C por 30 segundos;
- (8) Repite pasos 6 y 7 treinta y nueve (39) veces;
- (9) 72°C por 5 minutos;

En el primer ciclo de PCR la temperatura de recocido estaba cerca de la temperatura de fusión de la región de recocido 3' de las segundas plantillas, que fue de 37°C. La temperatura de recocido en el segundo ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recocó al templete de ADN de la primera plantilla, que fue de 57°C. La temperatura de recocido del tercer ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla, que fue de 64°C. La temperatura de recocido para los ciclos restantes fue de 64°C. La escalación de la temperatura de recocido de TM1 a TM2 a TM3 en los tres primeros ciclos de PCR mejora la especificidad grandemente. Estas temperaturas de recocido son representativas, y el experto entenderá que las temperaturas de recocido de cada ciclo dependen de las plantillas específicas usadas.

Las temperaturas y tiempos para la desnaturalización, recocido y extensión se pueden optimizar probando varios ajustes y usando los parámetros que produjeron los mejores resultados.

Análisis del Gel de Agarosa

Se analizaron cuatro microlitros de una reacción de PCR de veinte microlitros para cada SNP del templete de ADN original, mediante electroforesis en gel de agarosa (ver FIG. 18A). Cuatro microlitros de una reacción de PCR de veinte microlitros para cada SNP que fue amplificado del templete multiplexado, fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (ver FIG. 18B).

Como se ve en la figura 18A, para 8/9 de los SNPs amplificados del templete de ADN original se vió una banda simple de alta intensidad (líneas 1-3 y 5-9). La banda migró a la posición correcta para cada uno de los 8 SNPs. La amplificación de TSC1261039 del templete de ADN original

produjo una banda de alta intensidad que migró a la posición correcta, y una banda tenue de peso molecular más bajo (línea 4). Solo se vieron dos bandas, y las bandas se pudieron distinguir con base en el peso molecular. El método de PCR descrito aquí permite la amplificación limpia de los sitios de interés del ADN genómico sin ninguna concentración o enriquecimiento de los sitios de interés.

Como se ve en la FIG. 18B, las plantillas usadas para amplificar los SNPs TSC0397235, TSC0470003, TSC0128307 del template de ADN multiplexado produjeron una banda simple de alta intensidad que migró a la posición correcta (líneas 1, 2, 5 y 8). No se introdujeron bandas adicionales a pesar del hecho de que la reacción multiplex contenía doscientas plantillas. Aunque las plantillas multiplex eran de 12 bases de longitud y probablemente se recocen a secuencias adicionales a las localizadas en el cromosoma 21, los productos no se vieron porque las bandas no fueron ampliadas en la segunda reacción de PCR. La segunda reacción de PCR usó plantillas específicas para los sitios de interés, y usó oligonucleótidos asimétricos y temperaturas de recocido de escalación, lo que permitió la amplificación específica del genoma (ver Ejemplo 1).

La amplificación de TSC1649726 del template de ADN multiplex produjo una banda de alta intensidad y dos bandas más débiles, que se pudieron distinguir claramente con base en el peso molecular (ver FIG. 18B, línea 3). La amplificación de TSC1261039 del template de ADN multiplex produjo una banda de alta intensidad del peso molecular correcto y una banda tenue de peso molecular más bajo (ver FIG. 18B, línea 4). La banda de peso molecular más bajo era del mismo tamaño de la banda vista en la amplificación de TSC1261039 del template de ADN original (comparar FIG. 18A, línea 4 con FIG. 18B, línea 4). Así, la amplificación de TSC1261039 en el template de ADN multiplex no introdujo bandas adicionales no específicas.

La amplificación de los SNPs TSC1650432, TSC1335008 y TSC0259757 del template de ADN multiplex produjo una banda de alta intensidad que migró a la posición correcta, y una banda más débil (líneas 6, 7 y 9). Para los SNPs TSC1650432 y TSC0259757, la banda más débil era de peso molecular más bajo y se distinguía claramente de la banda de

interés (ver FIG. 18B, líneas 6 y 9). Para SNP TSC1335008, la banda más débil era de peso molecular ligeramente más alto. Sin embargo, la banda correcta se puede identificar mediante la comparación de los productos de amplificación de TSC1335008 con el template de ADN original (compare FIG. 18A, línea 7 y FIG. 18B, línea 7). Las condiciones de PCR también se pueden optimizar para TSC1335008. Todos los 9 SNPs fueron amplificados bajos las mismas condiciones exactas que produjeron bandas claramente distinguibles para los SNPs amplificados.

Purificación del Fragmento de Interés

Los productos de PCR fueron separados del template de ADN genómico. La mitad de la reacción de PCR fue transferida a un agujero de una placa Streptawell transparente de Alto Enlace, de Roche Diagnostics GmbH (número de catálogo 1 645 692, como se lista en Roche Molecular Biochemicals, Catálogo de Bioquímicos 2001). Las primeras plantillas contenían un marcador de biotina 5' de forma que los productos de PCR se enlazaron a los agujeros recubiertos de Estreptavidina, mientras que el template de ADN genómico no lo hizo. La reacción de ligamiento de estreptavidina se realizó usando un Termomezclador (Eppendorf) a 1000 rpm por 20 min., a 37°C. Cada agujero fue aspirado para remover el material no enlazado, y fue lavado tres veces con PBS 1X, con cuidadoso mezclado (Kandpal et al., Nucl. Acid Res. 18:1789-1795 (1990)); Kaneoka et al., Biotechniques 10:30-34 (1991); Green et al., Nucleic Acids Res. 18:6163-6164 (1990)).

Digestión de la enzima de restricción de los fragmentos aislados

Los productos de PCR purificados fueron digeridos con la enzima de restricción BsmF I, que se enlaza al sitio de reconocimiento incorporado en los productos de PCR de la segunda plantilla. Las digestiones fueron realizadas en los streptawells, siguiendo las instrucciones suministradas con la enzima de restricción. Después de la digestión, los agujeros fueron lavados tres veces con PBS para remover los fragmentos clivados.

Incorporación del Nucleótido Marcado

La digestión de la enzima de restricción con BsmF I produjo un fragmento de ADN con una proyección 5', que contenía el sitio SNP o sitio de interés, y un extremo 3' suspendido. La proyección 5' funcionó como un template que permitía la incorporación de un nucleótido o nucleótidos en presencia de una polimerasa de ADN.

Como se discutió en detalle en el Ejemplo 6, la secuencia de ambos alelos de un SNP se puede determinar mediante el uso de un nucleótido marcado, en presencia de otros nucleótidos no marcados. Se agregaron los siguientes componentes a cada reacción de llenado: 1 μ l de ddGTP marcado fluorescentemente, 0.5 μ l de ddNTPs no marcados (40 μ M), que contenían todos los nucleótidos excepto guanina, 2 μ l de buffer de secuencia 10X, 0.25 μ l de Secuencia, y agua según se necesite para una reacción de 20 μ l. La reacción de llenado se realizó a 40°C por 10 min. El ddNTP marcado no-fluorescentemente se compró en Fermentas Inc. (Hanover, MD). Todos los otros reactivos de marcado se obtuvieron en Amersham (Kit Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Core, US 79565).

Después del marcado, cada streptawell fue lavado con PBS 1X (100 μ l) tres veces. Los fragmentos de ADN "llenados" fueron luego liberados de los streptawell mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI, según las instrucciones del fabricante que fueron suministradas con la enzima. La digestión se realizó por 1 hora a 37°C con agitación a 120 rpm.

Detección del Sitio de interés

Las muestras fueron cargadas en una línea de un gel de acrilamida al 5% (urea) de 36 cm (Bio Whittaker Molecular Applications, Long Ranger Run Gel Packs, número de catálogo 50691). Las muestras se sometieron a electroforesis en el gel a 3000 voltios por 3 min. El gel se corrió por 3 horas en un aparato de secuenciamiento (Hoefer SQ3 Sequencer). El gel fue removido del aparato y fue rastreado en el Typhoon 9400 Variable Mode Imager. El nucleótido marcado incorporado fue detectado mediante fluorescencia. Se extrajo una caja alrededor de cada banda, y la intensidad de la banda se calculó usando el software de Typhoon 9400 Variable Mode Imager.

A continuación se muestra un esquema de proyección 5' para TSC0470003 después de la digestión con BsmF I

	5' CTCT				
	3' GAGA	R	A	C	C
Posición de la proyección	1	2	3	4	

Los nucleótidos observados para TSC04700003 son adenina y guanina en la la dirección de la cadena (descrita aquí como la cadena superior). La tercera posición de la proyección corresponde a citosina que es complementaria a guanina. Se usó el ddGTP marcado en presencia de dATP, dCTP y dTTP no marcados. Los esquemas de las moléculas de ADN después de la reacción de llenado se ilustran a continuación:

Alelo 1	5' CTCT	G*			
	3' GAGA	C	A	C	C
Posición de la proyección		1	2	3	4

Alelo 2	5' CTCT	A	T	G*	
	3' GAGA	T	A	C	C
Posición de la proyección		1	2	3	4

Se vieron dos bandas; la banda de peso molecular más bajo correspondía a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección, y la banda de peso molecular más alto correspondía a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección (ver FIG. 19).

Se calculó el porcentaje de alelo 2 a alelo 1 en TSC0470003 después de la amplificación del ADN original y el template de ADN multiplexado. El uso de un nucleótido marcado fluorescentemente para detectar ambos alelos en una reacción simple reduce la cantidad de errores introducidos en las reacciones de pipeteado, y el error que se introduce a través de los coeficientes cuánticos de colorantes diferentes.

Para SNP TSC047003, el porcentaje de alelo 2 a alelo 1 se calculó dividiendo el valor de alelo 2 entre la suma de los valores de alelo 2 y alelo 1. Se calculó que el porcentaje de alelo 2 a alelo 1 para TSC047003 en el template de ADN original era de 0.539 (ver Tabla XIX). Se realizaron tres reacciones de PCR para cada SNP en el template de ADN multiplexado. El promedio de porcentaje de alelo 2 a alelo 1 para TSC047003 en el ADN multiplexado fue de 0.49 con una desviación estándar de 0.0319 (ver Tabla XIX). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje obtenido en el template de ADN original y el template de ADN multiplexado.

Para SNP TSC1261069, se calculó que el porcentaje de alelo 2 a alelo 1 para TSC1261039 en el template de ADN original era de 0.44 (ver Tabla XIX). Se realizaron tres reacciones de PCR para cada SNP en el template de ADN multiplexado (ver FIG. 19B). El promedio de porcentaje de alelo 2 a alelo 1 para TSC1261039 en el ADN multiplexado fue de 0.468 con una desviación estándar de 0.05683 (ver Tabla XIX). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de alelo 2 a alelo 1 obtenidos en el template de ADN original y en el template de ADN multiplexado.

La variación vista en el porcentaje de alelo 2 a alelo 1 para TSC1261039 en el template de ADN multiplexado se debió probablemente a las reacciones de pipeteado. La variación se puede reducir aumentando el número de réplicas. Con un gran número de réplicas se puede obtener un porcentaje con mínima variación estadística.

Asimismo, no hubo diferencia estadística entre el porcentaje de alelo 2 a alelo 1 en el template de ADN original y en el template de ADN multiplexed para los SNPs TSC0310507 y TSC1335008 (ver Tabla XIX y FIGS. 19C y 19D). Así, se puede usar una reacción multiplex para aumentar el número de regiones cromosómicas que contienen los sitios de interés sin afectar el porcentaje de un alelo a otro en los sitios variables.

TABLA XIX. Porcentaje de alelo 2 a alelo 1 en varios SNPs con y sin multiplexion.

TSC047003			
	Alelo 1	Alelo 2	2/(2+1)
IA	5535418	6487873	0.539608748
M1	4804358	4886716	0.504249168
M2	5549389	5958585	0.517778803
M3	8356275	7030245	0.45690936
Media (M1-M3)			0.49297911
Desv. Std.			0.031961429
TSC1261039			
	Alelo 1	Alelo 2	2/(2+1)
IA	3488765	2768066	0.442407027
M1	3603388	2573244	0.41660957
M2	4470423	5026872	0.529295131
M3	4306015	36694012	0.46008898
Media (M1-M3)			0.46866456
Desv. Std.			0.056830136
TSC0310507			
	Alelo 1	Alelo 2	2/(2+1)
IA	2966511	2688180	0.475390299
M1	4084472	2963451	0.420471535
M2	4509891	4052892	0.47331481
M3	7173191	4642069	0.39288759
Media (M1-M3)			0.428891312
Desv. Std.			0.040869352
TSC1335008			
	Alelo 1	Alelo 2	2/(2+1)

IA	2311629	2553016	0.524810341
M1	794790	900879	0.531282343
M2	1261568	1780689	0.5853184
M3	1165156	1427840	0.550653
Media (M1-M3)			0.555751248
Desv. Std.			0.027376412

Los métodos descritos aquí usaron dos reacciones de amplificación distintas para amplificar los sitios de interés. En la primera reacción de PCR se diseñaron oligonucleótidos para reconocerse aguas arriba y aguas debajo de los sitios de interés. Contraria a la amplificación genómica tradicional, estas plantillas no se degeneraron y se cocieron a una distancia específica del sitio de interés. Sin embargo, debido a la longitud de las plantillas, es probable que las plantillas se cocieran en otras regiones del genoma. Estas plantillas se usaron para aumentar la disponibilidad de ADN para análisis genético.

La segunda reacción de PCR usa los métodos descritos en los Ejemplos 1-6. Las plantillas están diseñadas para amplificar los sitios de interés, y se determina la secuencia en los sitios de interés. Las condiciones de la segunda reacción de PCR permitieron la amplificación específica de los sitios de interés del template de ADN multiplexado. Si hubo productos no específicos de la reacción multiplex, estos no impidieron la amplificación de los sitios de interés. No hubo diferencia estadística en los porcentajes de alelo 2 a alelo 1 en los cuatro SNPs analizados, sin importar si la amplificación se realizó en el template de ADN original o en el template de ADN multiplexado.

Los SNPs analizados en este ejemplo estaban localizados en el cromosoma humano 21. Sin embargo, los métodos se pueden aplicar a ADN humano y no humano incluyendo, pero sin limitarse a cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, Y y Y. Los métodos multiplex también se pueden aplicar al análisis de mutaciones genéticas que incluyen, si limitarse a sustituciones de nucleótido, inserciones, eliminaciones y redistribuciones.

Los métodos anteriores se pueden usar para aumentar la cantidad de ADN disponible para análisis genético cuando el template de ADN de partida está limitado en cantidad. Por ejemplo, las lesiones pre-malignas y pre-invasivas con células malignas usualmente constituyen una pequeña fracción de las células en el espécimen, que reducen el número de análisis genéticos que se pueden realizar. Los métodos descritos aquí se pueden usar para aumentar las cantidades de ADN maligno disponible para análisis genético. Además, el número de genomas fetales presentes en la sangre materna usualmente es bajo; los métodos descritos aquí se pueden usar para aumentar la cantidad de ADN fetal.

EJEMPLO 13

El plasma aislado de una muestra de sangre de una hembra embarazada contiene tanto template de ADN materno como template de ADN fetal. Como se discutió anteriormente, el porcentaje de ADN fetal en el plasma materno varía en cada hembra embarazada. Sin embargo, el porcentaje de ADN fetal se puede determinar mediante el análisis de los SNPs en donde el template de ADN materno es homocigótico y el template de ADN obtenido del plasma muestra un modelo heterocigótico.

Por ejemplo, asuma que el SNP X puede ser adenina o guanina, y el ADN materno para SNP X es homocigótico para guanina. El método de marcado descrito en el Ejemplo 6 se puede usar para determinar la secuencia del template de ADN en la muestra de plasma. Si la muestra de plasma contiene ADN fetal que es heterocigótico en SNP X, se esperan las siguientes moléculas después de la digestión con la enzima de restricción tipo IIS BsmF I, y de la reacción de llenado con ddGTP marcado, dATP, dTTP y dCTP no marcados.

Alelo 1 Materno	5' GGGT	G*			
	3' CCCA	C	T	C	A
Alelo 2 Materno	5' GGGT	G*			
	3' CCCA	C	T	C	C

Alelo 1 Fetal	5' GGGT	G*			
	3' CCCA	C	T	C	A
Alelo 2 Fetal	5' GGGT	A	A	G*	
	3' CCCA	T	T	C	A

Se ven dos señales; una señal corresponde a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición uno complementaria a la proyección, y la otra señal corresponde a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección. Sin embargo, el ADN materno es homocigótico para guanina, que corresponde a las moléculas de ADN llenadas en la posición uno complementaria a la proyección. La señal de las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección corresponde al alelo de adenina que representa el ADN fetal. Esta señal se convierte en una señal para el ADN fetal y se puede usar para medir la cantidad de ADN fetal presente en la muestra de plasma.

No hay diferencia en la cantidad de ADN fetal de un cromosoma a otro. Por ejemplo, el porcentaje de ADN fetal de cualquier individuo dado en el cromosoma 1 es el mismo porcentaje de ADN fetal en el cromosoma 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X y Y. Así, la relación de alelo calculada para los SNPs en un cromosoma se puede comparar con la relación de alelo para los SNPs en otro cromosoma.

Por ejemplo, la relación de alelo para los SNPs en el cromosoma 2 debe ser igual a la relación de alelo para los SNPs en los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X y Y. Sin embargo, si el feto tiene una anomalía cromosómica que incluye pero no se limita a una trisomía o monosomía, la relación para el cromosoma que está presente en el número de copia anormal será diferente de la relación en los otros cromosomas.

Se recolectó sangre de una hembra embarazada después de obtener su consentimiento. La muestra de sangre se usó para demostrar que se puede detectar el ADN fetal en el plasma materno mediante el análisis de los SNPs en donde el ADN materno era homocigótico, y el mismo SNP mostró

un modelo heterocigótico del ADN obtenido del plasma de una mujer embarazada.

Preparación del Plasma de la Sangre Completa

El plasma fue aislado de cuatro tubos que contenían cada uno 9 ml de sangre (Fischer Scientific, tubos Vacuette con 5 ml de EDTA, número de catálogo NC9897284). La sangre se obtuvo por venipuntura de una hembra embarazada que había dado su consentimiento. Después de recolectar la sangre, se agregó formaldehído (25 μ l/ml de sangre) a cada tubo. Los tubos fueron colocados a 4°C hasta el embarque. Los tubos fueron embarcados vía Federal Express en un contenedor de espuma en un empaque de hielo.

La sangre fue centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos. No se usó el freno en la centrífuga. Este paso de centrifugación se repitió. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se centrifugó a 3,000 rpm por diez minutos. No se usó el freno en la centrífuga. El sobrenadante de cada uno de los cuatro tubos se recolectó y alicuotó en dos tubos. El plasma se almacenó a -80°C hasta que el ADN fue purificado.

El template de ADN fue aislado usando el Kit QIAmp ADN Blood Midi suministrado por QIAGEN (número de catálogo 51183). El template de ADN fue aislado según las instrucciones incluidas en el kit. El template de ADN del plasma fue eluido en un volumen final de 20 microlitros.

Aislamiento del ADN materno

Después de remover el plasma de la muestra descrita anteriormente, un mililitro de la muestra de sangre restante, que comúnmente se refiere como "cubierta amarilla" se transfirió a un tubo nuevo. Se agregó un mililitro de PBS 1X a la muestra. El template de ADN fue aislado usando el Kit QIAmp ADN Blood Midi suministrado por QIAGEN (número de catálogo 51183).

Identificación de los SNPs Maternos Homocigóticos

El Ejemplo 8 describe un método para identificar los SNPs que son altamente variables en la población, o para identificar SNPs heterocigóticos para un individuo dado. Los métodos como se describen en el Ejemplo 8, fueron aplicados al template de ADN materno para identificar los SNPs en el cromosoma 13, en donde el ADN materno era homocigótico. Se puede detectar cualquier número de SNPs. El número de SNPs a ser detectado es proporcional al número de SNPs heterocigóticos en el ADN fetal que se necesita ser analizado.

Como se describe en detalle en el Ejemplo 6, se puede usar un nucleótido marcado para determinar la secuencia de ambos alelos en un SNP particular. Para este ejemplo se escogieron los SNPs para los cuales la secuencia se puede determinar con ddGTP marcado en presencia de dATP, dTTP y dCTP no marcados. Sin embargo, también se pueden usar SNPs a los que cuales se les puede determinar la secuencia con ddATP, ddCTP o ddTTP marcado. Además, los SNPs a ser analizados se pueden escoger de forma que todos sean marcados con el mismo nucleótido o cualquier combinación de nucleótido de los cuatro nucleótidos. Por ejemplo, si se van a detectar 400 SNPs, se pueden escoger 100 de forma que la secuencia sea determinada con ddATP marcado, se pueden escoger 100 de forma que la secuencia sea determinada con ddTTP marcado, se pueden escoger 100 de forma que la secuencia sea determinada con ddGTP marcado y se pueden escoger 100 de forma que la secuencia sea determinada con ddCTP marcado, o cualquier combinación de los cuatro nucleótidos marcados.

Se identificaron veintinueve SNPs en donde el ADN materno era homocigótico: TCS0052277, TSC1225391, TSC0289078, TSC1349804, TSC0870209, TSC0194938, TSC0820373, TSC0902859, TSC0501510, TSC1228234, TSC0082910, TSC0838335, TSC0818982, TSC0469204, TSC1084457, TSC0466177, TSC1270598, TSC1002017, TSC1104200, TSC0501389, TSC0039960, TSC0418134, TSC0603688, TSC0129188, TSC1103570, TSC813449, TSC0701940, TSC0087962 y TSC0660274. Los SNPs heterocigóticos variarán de individuo a individuo.

Diseño de las Plantillas Multiplex

Un bajo número de copias de genomas fetales están típicamente presentes en el plasma materno. Para aumentar el número de copias de los sitios de interés localizados en el cromosoma 21, las plantillas fueron diseñadas para recocerse a aproximadamente 130 bases aguas arriba y 130 bases aguas debajo de los sitios de interés. Esto se hizo para reducir el error de muestreo estadístico que puede ocurrir cuando se trabaja con un número bajo de genomas, que puede influir en la relación de un alelo a otro (ver Ejemplo 11). Las plantillas eran de 12 bases de longitud. Sin embargo, se puede usar plantillas de cualquier longitud incluyendo, pero sin limitarse a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36-45, 46-55, 56-65, 66-75, 76-85, 86-95, 96-105, 106-115, 116-125, y más de 125 bases. Las plantillas fueron diseñadas para recocerse en la dirección de la cadena y en la dirección contraria de la cadena.

Las plantillas fueron diseñadas para terminar en el extremo 3' en el nucleótido "AA" para reducir la formación de dimerización de la plantilla. Sin embargo, las plantillas se pueden diseñar para terminar en cualquiera de los cuatro nucleótidos y en cualquier combinación de los cuatro nucleótidos.

Las plantillas multiplex para SNPTSC0052277 fueron:

Plantilla delantera:

5' GACATGTTGGAA 3' (SEC ID No: 513)

Plantilla reversa:

5' ACTTCCAGTTAA 3' (SEC ID No: 514)

Las plantillas multiplex para SNP TSC1225391 fueron:

Plantilla delantera:

5' GTTTCCTGTTAA 3' (SEC ID No: 515)

Plantilla reversa:

5' CGATGATGACAA 3' (SEC ID No: 516)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0289078 fueron:

Plantilla delantera:

5' GAGTAGAGACAA 3' (SEC ID No: 517)

Plantilla reversa:

5' TCCCGGATACAA 3' (SEC ID No: 518)

Las plantillas multiplex para SNP TSC1349804 fueron:

Plantilla delantera:

5' CATCCTCATGAA 3' (SEC ID No: 519)

Plantilla reversa:

5' TATTCCTGAGAA 3' (SEC ID No: 520)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0870209 fueron:

Plantilla delantera:

5' AGTTTGTTTTAA 3' (SEC ID No: 521)

Plantilla reversa:

5' TATAACGATAA 3' (SEC ID No: 522)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0194938 fueron:

Plantilla delantera:

5' TTTGACCGATAA 3' (SEC ID No: 523)

Plantilla reversa:

5' TGACAGGACCAA 3' (SEC ID No: 524)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0820373 fueron:

Plantilla delantera:

5' TTATTCATTCAA 3' (SEC ID No: 525)

Plantilla reversa:

5' AGTTTTTCACAA 3' (SEC ID No: 526)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0902859 fueron:

Plantilla delantera:

5' CACCTCCCTGAA 3' (SEC ID No: 527)

Plantilla reversa:

5' CCAGATTGAGAA 3' (SEC ID No: 528)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0501510 fueron:

Plantilla delantera:

5' TGTGTCCACCAA 3' (SEC ID No: 529)

Plantilla reversa:

5' CTTCTATTCCAA 3' (SEC ID No: 530)

Las plantillas multiplex para SNP TSC1228234 fueron:

Plantilla delantera:

5' TCACAATAGGAA 3' (SEC ID No: 531)

Plantilla reversa:

5' TACAAGTGAGAA 3' (SEC ID No: 532)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0082910 fueron:

Plantilla delantera:

5' GAGTTTTTCGTAA 3' (SEC ID No: 533)

Plantilla reversa:

5' GTGTGCCCCCAA 3' (SEC ID No: 534)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0838335 fueron:

Plantilla delantera:

5' GCACCACTGCAA 3' (SEC ID No: 535)

Plantilla reversa:

5' GAACACAAT GAA 3' (SEC ID No: 536)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0818982 fueron:

Plantilla delantera:

5' TATCCTATTCAA 3' (SEC ID No: 537)

Plantilla reversa:

5' CAACCATTATAA 3' (SEC ID No: 538)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0469204 fueron:

Plantilla delantera:

5' TATGCTTTACAA 3' (SEC ID No: 539)

Plantilla reversa:

5' TTTGTTTACCAA 3' (SEC ID No: 540)

Las plantillas multiplex para SNP TSC1084457 fueron:

Plantilla delantera:

5' AGGAAATTAGAA 3' (SEC ID No: 541)

Plantilla reversa:

5' TGTTAGACTTAA 3' (SEC ID No: 542)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0466177 fueron:

Plantilla delantera:

5' TATTTGGAGGAA 3' (SEC ID No: 543)

Plantilla reversa:

5' GGCATTTGTCAA 3' (SEC ID No: 544)

Las plantillas multiplex para SNP TSC1270598 fueron:

Plantilla delantera:

5' ATACTCCAGGAA 3' (SEC ID No: 545)

Plantilla reversa:

5' CAGCCTGGACAA 3' (SEC ID No: 546)

Las plantillas multiplex para SNP TSC1002017 fueron:

Plantilla delantera:

5' CCATTGCAGTAA 3' (SEC ID No: 547)

Plantilla reversa:

5' AGGTTCTCATAA 3' (SEC ID No: 548)

Las plantillas multiplex para SNP TSC1104200 fueron:

Plantilla delantera:

5' TGTCATCATTA 3' (SEC ID No: 549)

Plantilla reversa:

5' TGGTATTTGCAA 3' (SEC ID No: 550)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0501389 fueron:

Plantilla delantera:

5' TAGGGTTTGTA 3' (SEC ID No: 551)

Plantilla reversa:

5' CCCTAAGTAGAA 3' (SEC ID No: 552)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0039960 fueron:

Plantilla delantera:

5' GTATTTCTTTAA 3' (SEC ID No: 553)

Plantilla reversa:

5' GAGTCTTCCCAA 3' (SEC ID No: 554)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0418134 fueron:

Plantilla delantera:

5' CAGGTAGAGTAA 3' (SEC ID No: 555)

Plantilla reversa:

5' ATAGGATGTGAA 3' (SEC ID No: 556)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0603688 fueron:

Plantilla delantera:

5' CAATGTGTATA 3' (SEC ID No: 557)

Plantilla reversa:

5' AGAGGGCATCAA 3' (SEC ID No: 558)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0129188 fueron:

Plantilla delantera:

5' CCAGTGGTCTAA 3' (SEC ID No: 559)

Plantilla reversa:

5' TAAACAATAGAA 3' (SEC ID No: 560)

Las plantillas multiplex para SNP TSC1103570 fueron:

Plantilla delantera:

5' GCACACTTTTAA 3' (SEC ID No: 561)

Plantilla reversa:

5' ATGGCTCTGCAA 3' (SEC ID No: 562)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0813449 fueron:

Plantilla delantera:

5' GTCATCTTGTA 3' (SEC ID No: 563)

Plantilla reversa:

5' TGCTTCATCTAA 3' (SEC ID No: 564)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0701940 fueron:

Plantilla delantera:

5' AGAAAGGGGCAA 3' (SEC ID No: 565)

Plantilla reversa:

5' CTTTCTTTCAA 3' (SEC ID No: 566)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0087962 fueron:

Plantilla delantera:

5' CTA CTCTCTCAA 3' (SEC ID No: 567)

Plantilla reversa:

5' ACAGCATTATAA 3' (SEC ID No: 568)

Las plantillas multiplex para SNP TSC0660274 fueron:

Plantilla delantera:

5' ACTGCTCTGGAA 3' (SEC ID No: 569)

Plantilla reversa:

5' GCAGAGGCACAA 3' (SEC ID No: 570)

PCR Multiplex

Las regiones en el cromosoma 13 circundantes a los 29 SNPs fueron ampliadas del template de ADN genómico usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR, Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202, incorporadas a este como referencia). Esta reacción de PCR usó plantillas que se cocieron aproximadamente a 150 bases aguas arriba y aguas abajo de los sitios de interés. Las cincuenta y ocho plantillas fueron mezcladas juntas y se usaron en una reacción simple para amplificar el template de ADN. Esta reacción se usó para aumentar el número de copias de los sitios de interés, que eliminan errores generados por un bajo número de genomas.

Para especificidad aumentada se usó una reacción de PCR de "inicio caliente". Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el Kit HotStarTaq Master Mix suministrado por QIAGEN (número de catálogo 203443). La cantidad de template de ADN y plantilla por reacción se puede optimizar para cada sitio de interés. En este ejemplo se usaron 20 µl de template de ADN de plasma.

Dos microlitros de cada plantilla delantera y reversa, a concentraciones de 5 mM se recolectaron en un tubo de microcentrífuga simple y se mezclaron. Se usaron cuatro microlitros de la mezcla de plantilla en un volumen total de reacción PCR de 50 µl (20 µl de template de ADN de plasma, 1 µl de agua estéril, 4 µl de mezcla de primer, y 25 µl de HotStar Taq Mix). Se realizaron veinticinco ciclos de PCR. Se usaron las siguientes condiciones de PCR:

- (1) 95°C por 15 minutos;
- (2) 95°C por 30 segundos;
- (3) 4°C por 30 segundos;
- (4) 37°C por 30 segundos;
- (5) Repite pasos 2-4 veinticuatro (24) veces;
- (6) 72°C por 10 minutos;

Las temperaturas y tiempos para la desnaturalización, recocido y extensión se pueden optimizar probando varios ajustes y usando los parámetros que produjeron los mejores resultados.

También se pueden usar otros métodos de amplificación genómica para aumentar el número de copias de los sitios de interés, incluyendo, pero sin limitarse a preamplificación de la extensión de la plantilla (PEP) (*Zhang et al.*, PNAS, 89:5847-51, 1992), PCR de oligonucleótido degenerado por plantilla (DOP-PCR) (*Telenius, et al.*, Genomics, 13:718-25, 1992), amplificación de desplazamiento de cadena usando polimerasa de ADN de bacteriofago 29, que sufre la replicación de círculo generados (*Dean et al.*, Genomic Research 11:1095-99, 2001), amplificación de desplazamiento múltiple (Patente U.S. 6,124,120), kits de Amplificación del Genoma Entero REPLY-g™, y PCR marcada.

Purificación del Fragmento de Interés

Las plantillas y nucleótidos no usados fueron removidos de la reacción usando los kits de Purificación de PCR Qiagen MinElute (Qiagen, Número de Catálogo 28004). Las reacciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante suministradas con las columnas. El ADN fue eluido en 100 µl de agua estéril.

Reacción Dos de PCR

Diseño de las Plantillas:

El SNP TSC0052277 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' CTCCGTGGTATGGAATTCCACTCAAATCTTCATTCAGA 3' (SEC ID No. 571)

Segunda plantilla:

5' ACGTCGGGTTACGGGACACCTGATTCCTC 3' (SEC ID No. 572)

El SNP TSC1225391 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' TACCATTGGTTTGAATTCTTGTTTCCTGTTAACCATGC 3' (SEC ID No. 573)

Segunda plantilla:

5' GCCGAGTTCTACGGGACAGAAAAGGGAGC 3' (SEC ID No. 574)

El SNP TSC0289078 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' TGCAGTGATTTCGAATTCGAGACAATGCTGCCCAGTCA 3' (SEC ID No. 575)

Segunda plantilla:

5' TCTAAATTCTCTGGGACCATTCTTCAAC 3' (SEC ID No. 576)

El SNP TSC1349804 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' ACTAACAGCACTGAATTCCATGCTCTTGGACTTTCCAT 3' (SEC ID No. 577)

Segunda plantilla:

5' TCCCCTAACGTTGGGACACAGAATACTAC 3' (SEC ID No. 578)

El SNP TSC0870209 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' GTCGACGATGGCGAATTCCTGCCACTCATTAGTTAGC 3' (SEC ID No. 579)

Segunda plantilla:

5' GAACGGCCACAGGGACCTGGCATAACTC 3' (SEC ID No. 580)

El SNP TSC0194938 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' TCATGGTAGCAGGAATTCTGCTTTGACCGATAAGGAGA 3' (SEC ID No. 581)

Segunda plantilla:

5' ACTGTGGGATTCTGGGACTGTCTACTACCC 3' (SEC ID No. 582)

El SNP TSC0820373 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' ACCTCTCGGCCGGAATTCGGAAAAGTGTACAGATCATT 3' (SEC ID No. 583)

Segunda plantilla:

5' GCCGGATACGAAGGGACGGCTCGTGACT 3' (SEC ID No. 584)

El SNP TSC0902859 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' CCGTAGACTAAAGAATTCCCTGATGTCAGGCTGTCACC 3' (SEC ID No. 585)

Segunda plantilla:

5' ATCGGATCAGTCGGGACGGTGTCTTTGCC 3' (SEC ID No. 586)

El SNP TSC0501510 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' GCATAGGCGGGAGAATTCCCTGTGTCCACCAAAGTCGG 3' (SEC ID No. 587)

Segunda plantilla:

5' CCCACATAGGGCGGGACAAAGAGCTGAAC 3' (SEC ID No. 588)

El SNP TSC1228234 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' GGCTTGCCGAGCGAA TTCTAGGAAAGATACGGAATCAA 3' (SEC ID No. 589)

Segunda plantilla:

5' TAACCCTCATACGGGACTTTCATGGAAGC 3' (SEC ID No. 590)

El SNP TSC0082910 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' ATGAGCACCCGGGAATTCTGATTGGAGTCTAGGCCAAA 3' (SEC ID No. 591)

Segunda plantilla:

5' TGCTCACCTTCTGGGACGTGGCTGGTCTC 3' (SEC ID No. 592)

El SNP TSC0838335 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' ACCGTCTGCCACGAATTCTGGAAAACATGCAGTCTGGT 3' (SEC ID No. 593)

Segunda plantilla:

5' TACACGGGAGGCGGGACAGGGTGATTAAC 3' (SEC ID No. 594)

El SNP TSC0818982 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' CTAAAGCTAACGAATTCAGAGCTGTATGAAGATGCTT 3' (SEC ID No. 595)

Segunda plantilla:

5' AACGCTAAAGGGGGGACAAACATAATTGGC 3' (SEC ID No. 596)

El SNP TSC0469204 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' TTGTAAGAACGAGAATTCTGCAACCTGTCTTTATTGAA 3' (SEC ID No. 597)

Segunda plantilla:

5' CTTCACTACTTTGGGACACTGAAGCCAAC 3' (SEC ID No. 598)

El SNP TSC1084457 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' AACCATTTGATTTGAATTCGAAATGTCCACCAAAGTTCA 3' (SEC ID No. 599)

Segunda plantilla:

5' TGTCTAGTTCCAGGGACGCTGTTACTTAC 3' (SEC ID No. 600)

El SNP TSC0466177 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' CGAAGGTAATGTGAATTCTGCCACAATTAAGACTTGGA 3' (SEC ID No. 601)

Segunda plantilla:

5' ATACCGGTTTTCTGGGACAGATCCATTGAC 3' (SEC ID No. 602)

El SNP TSC1270598 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' CCTGAAATCCACGAATTCCACCCTGGCCTCCCAGTGCA 3' (SEC ID No. 603)

Segunda plantilla:

5' TAGATGGTAGGTGGGACAGGACTGGCTTC 3' (SEC ID No. 604)

El SNP TSC1002017 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' GCATATCTTAGCGAATTCCTGTGACTAATACAGAGTGC 3' (SEC ID No. 605)

Segunda plantilla:

5' CCAAATATGGTAGGGACGTGTGAACACTC 3' (SEC ID No. 606)

El SNP TSC1104200 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' TGCCGCTACAGGGAATTCATATGGCAGATATTCCTGAA 3' (SEC ID No. 607)

Segunda plantilla:

5' ACGTTGCGGACCGGGACTTCCACAGAGCC 3' (SEC ID No. 608)

El SNP TSC0501389 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' CTTCGCCCAATGGAATTCGGTACAGGGGTATGCCTTAT 3' (SEC ID No. 609)

Segunda plantilla:

5' TGCACTTCTGCCGGGACCAGAGGAGAAAC 3' (SEC ID No. 610)

El SNP TSC0039960 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' TGTGGGTATTCTGAATTCACAAAATGGACTAACACGC 3' (SEC ID No. 611)

Segunda plantilla:

5' ACGTCGTTGAGTGGGACATTAAAAGGCTC 3' (SEC ID No. 612)

El SNP TSC0418134 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' GGTTATGTGTCAGAATTCTGAACTAGTTTGGAAGTAC 3' (SEC ID No. 613)

Segunda plantilla:

5' GCCTCAGTTTCGGGGACAGTTCTGAGGAC 3' (SEC ID No. 614)

El SNP TSC0603688 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' TGTAACACGGCCGAATTCCTCATTGTATGAAATAGGT 3' (SEC ID No. 615)

Segunda plantilla:

5' AATCTAACTTGAGGGACCGGCACACACAC 3' (SEC ID No. 616)

El SNP TSC0129188 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' AGTGTCCCTTAGAATTCGCAGAGACACCACAGTGTGC 3' (SEC ID No. 617)

Segunda plantilla:

5' TTTGCTACAGTCGGGACCCTTGTGTGCTC 3' (SEC ID No. 618)

El SNP TSC1103570 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' AGCACATCACTAGAATTCAATACCATGTGTGAGCTCAA 3' (SEC ID No. 619)

Segunda plantilla:

5' AATCCTGCTTCCGGGACCTAACTTTGAAC 3' (SEC ID No. 620)

El SNP TSC0813449 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' TTTCATTTTCTGGAATTCCTCTAATGATTTTCTGGAGC 3' (SEC ID No. 621)

Segunda plantilla:

5' CGTCGCCGCGTAGGGACTTTTTCTTCCAC 3' (SEC ID No. 622)

El SNP TSC0701940 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' TTAACCTGAATTCGAGAAAAGCCATGTTGATAA 3' (SEC ID No. 623)

Segunda plantilla:

5' TCATGGGTCGCTGGGACTTTGCCCTCTGC 3' (SEC ID No. 624)

El SNP TSC0087962 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' ACTAACAGCACTGAATTCATTTTACTATAATCTGCTAC 3' (SEC ID No. 625)

Segunda plantilla:

5' GTTAGCCGAGAAGGGACTGTCTGTGAAGC 3' (SEC ID No. 626)

El SNP TSC0680274 se amplió usando el siguiente juego de plantillas:

Primera plantilla:

5' AAATATGCAGCGGAATTCGTAAGTGACCTATTAATAAC 3' (SEC ID No. 627)

Segunda plantilla:

5' GCGATGGTTACGGGGACAGCCAGGCAACC 3' (SEC ID No. 628)

Cada Primera plantilla tenía un marcador de biotina en el extremo 5' y contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, y fue diseñado para recocerse a una distancia especificada de los sitios de interés. Esto permite realizar una reacción simple para el sitio de interés, porque cada sitio de interés migrará a una posición distinta (con base en la posición de recocido de la primera plantilla). La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para BsmF I.

Todos los sitios de interés fueron amplificados de los templates de ADN multiplexados usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR, Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202, incorporadas a este como referencia). En este ejemplo los sitios de interés fueron amplificados en tubos de reacción separados aunque también se podían amplificar juntos en

una reacción de PCR simple. Para especificidad aumentada se usó una PCR de "inicio caliente". Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el Kit HotStarTaq Master Mix suministrado por QIAGEN (número de catálogo 203443).

La cantidad de template de ADN multiplexado y de plantilla por reacción se puede optimizar para cada sitio de interés. Se usó un microlitro del template de ADN multiplexado eluido de una columna MinElute en la reacción de PCR para cada sitio de interés, y se usaron 5 µl de cada plantilla. Los veintinueve SNPs descritos anteriormente fueron amplificados del ADN materno (se usaron 15 ng de ADN en la reacción de PCR; las concentraciones de plantilla fueron como se indicaron anteriormente). Se realizaron cuarenta ciclos de PCR. Se usaron las siguientes condiciones de PCR:

- (1) 95°C por 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C por 30 segundos;
- (3) 95°C por 30 segundos;
- (4) 57°C por 30 segundos;
- (5) 95°C por 30 segundos;
- (6) 64°C por 30 segundos;
- (7) 95°C por 30 segundos;
- (8) Repite pasos 6 y 7 treinta y nueve (39) veces;
- (9) 72°C por 5 minutos;

En el primer ciclo de PCR la temperatura de recocido estaba cerca de la temperatura de fusión de la región de recocido 3' de las segundas plantillas, que fue de 37°C. La temperatura de recocido en el segundo ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la región 3', que se recoge al template de ADN de la primera plantilla, que fue de 57°C. La temperatura de recocido del tercer ciclo de PCR estaba cerca de la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla, que fue de 64°C. La temperatura de recocido para los ciclos restantes fue de 64°C. La escalación de la temperatura de recocido de TM1 a TM2 a TM3 en los tres primeros ciclos de PCR mejora la especificidad grandemente. Estas temperaturas de recocido son representativas, y el experto entenderá que

las temperaturas de recocido de cada ciclo dependen de las plantillas específicas usadas.

Las temperaturas y tiempos para la desnaturalización, recocido y extensión se pueden optimizar probando varios ajustes y usando los parámetros que produjeron los mejores resultados. En este ejemplo la primera plantilla se diseñó para recocerse a varias distancias del sitio de interés. El experto entenderá que la ubicación de recocido de la primera plantilla puede ser a 5-10, 11-15, 16-20, 21-25, 26-30, 31-35, 36-40, 41-45, 46-50, 51-55, 56-60, 61-65, 66-70, 71-75, 76-80, 81-85, 86-90, 91-95, 96-100, 101-105, 106-110, 111-115, 116-120, 121-125, 126-130, 131-140, 140-160, 160-180, 180-200, 200-220, 220-240, 240-260, 260-280, 280-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500 o a más de 500 bases del sitio de interés.

Purificación del Fragmento de Interés

Los productos de PCR fueron separados del template de ADN genómico. Cada producto de PCR se colocó en un agujero de una placa Streptawell transparente de Alto Enlace, de Roche Diagnostics GmbH (número de catálogo 1 645 692, como se lista en Roche Molecular Biochemicals, Catálogo de Bioquímicos 2001). Alternativamente, los productos de PCR se pueden recolectar en un agujero simple porque la primera plantilla fue diseñado para permitir que los sitios de interés se separen con base en el peso molecular. Las primeras plantillas contenían un marcador de biotina 5' de forma que los productos de PCR se enlazaron a los agujeros recubiertos de Estreptavidina, mientras que el template de ADN genómico no lo hizo. La reacción de ligamiento de estreptavidina se realizó usando un Termomezclador (Eppendorf) a 1000 rpm por 20 min., a 37°C. Cada agujero fue aspirado para remover el material no enlazado, y fue lavado tres veces con PBS 1X, con cuidadoso mezclado (Kandpal et al., Nucl. Acid Res. 18:1789-1795 (1990)); Kaneoka et al., Biotechniques 10:30-34 (1991); Green et al., Nucleic Acids Res. 18:6163-6164 (1990)).

Digestión de la enzima de restricción de los fragmentos aislados

Los productos de PCR purificados fueron digeridos con la enzima de restricción BsmF I, que se enlaza al sitio de reconocimiento incorporado en

los productos de PCR de la segunda plantilla. Las digestiones fueron realizadas en los streptawells, siguiendo las instrucciones suministradas con la enzima de restricción. Después de la digestión, los agujeros fueron lavados tres veces con PBS para remover los fragmentos clivados.

Incorporación del Nucleótido Marcado

La digestión de la enzima de restricción con BsmF I produjo un fragmento de ADN con una proyección 5', que contenía el sitio SNP o sitio de interés, y un extremo 3' suspendido. La proyección 5' funcionó como un template que permitía la incorporación de un nucleótido o nucleótidos en presencia de una polimerasa de ADN.

Como se demostró en el Ejemplo 6, la secuencia de ambos alelos de un SNP se puede determinar mediante el llenado de la proyección con un nucleótido marcado, en presencia de otros nucleótidos no marcados. Se agregaron los siguientes componentes a cada reacción de llenado: 1 μ l de ddGTP marcado fluorescentemente, 0.5 μ l de ddNTPs no marcados (40 μ M), que contenían todos los nucleótidos excepto guanina, 2 μ l de buffer de secuenasa 10X, 0.25 μ l de Secuenasa, y agua según se necesite para una reacción de 20 μ l. La reacción de llenado se realizó a 40°C por 10 min. El ddNTP marcado no-fluorescentemente se compró en Fermentas Inc. (Hanover, MD). Todos los otros reactivos de marcado se obtuvieron en Amersham (Kit Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Core, US 79565).

Después del marcado, cada streptawell fue lavado con PBS 1X (100 μ l) tres veces. Los fragmentos de ADN "llenados" fueron luego liberados de los streptawell mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI, según las instrucciones del fabricante que fueron suministradas con la enzima. La digestión se realizó por 1 hora a 37°C con agitación a 120 rpm.

Detección del Sitio de interés

Después de la liberación de la matriz de estreptavidina, la muestra fue cargada en una línea de un gel de acrilamida al 5% (urea) de 36 cm (Bio

Whittaker Molecular Applications, Long Ranger Run Gel Packs, número de catálogo 50691). La muestra se sometió a electroforesis en el gel a 3000 voltios por 3 min. El gel se corrió por 3 horas en un aparato de secuenciamiento (Hoefer SQ3 Sequencer). El gel fue removido del aparato y fue rastreado en el Typhoon 9400 Variable Mode Imager. El nucleótido marcado incorporado fue detectado mediante fluorescencia.

A continuación se ilustra un esquema de proyección 5' para SNP TSC0838335. La secuencia entera no se reproduce, solo la porción que ilustra la proyección (en donde R indica el sitio variable)

10/14	5' TAA				
	3' ATT	R	A	C	A
Posición de la proyección		1	2	3	4

Los nucleótidos observados para TSC0838335 son adenina y guanina en la dirección de la cadena de 5' (descrita aquí como la cadena superior). El nucleótido en la posición tres de la proyección correspondía a citosina, que es complementaria a guanina. Se puede usar ddGTP marcado para determinar la secuencia de ambos alelos, en presencia de dATP, dCTP y dDTP no marcados.

Se usó la enzima de restricción BsmF para crear la proyección 5', que típicamente se corta a 10/14 del sitio de reconocimiento. A veces, la BsmF I cortará a 11/15 del sitio de reconocimiento y generará la siguiente proyección:

11/15	5' TA				
	3' AT	T	R	A	C
Posición de la proyección		0	1	2	3

La posición 0 de la proyección es timidina, que es complementaria a adenina. La posición 0 complementaria a la proyección fue llenada con dATP no marcado, y de esta forma, después de la reacción de llenado, se generaron exactamente las mismas moléculas que si la enzima se cortara a 10/14 o a 11/15 del sitio de reconocimiento. Las moléculas de ADN generadas después de la reacción de llenado se describen a continuación:

Alelo G 10/14	5' TAA	G*			
	3' AAT	C	A	C	A
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo G 11/15	5' TA	A	G*		
	3' AT	T	C	A	C
Posición de la proyección		0	1	2	3
Alelo A 10/14	5' TAAA	T	G*		
	3' AATT	A	C	A	
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo A 11/15	5' TA	A	A	T	G*
	3' AT	T	T	A	C
Posición de la proyección		0	1	2	3

El template de ADN materno amplificado para TSC0838335 mostró una banda simple que migró a la posición esperada de la banda de peso molecular más alto, que correspondía al alelo "A" (ver FIG. 20, línea 1). El template de ADN materno era homocigótico para adenina en SNP TSC0838335.

Sin embargo, en la línea 2, la amplificación del template de ADN multiplexado para TSC0838335 aislado del plasma del mismo individuo mostró dos bandas; una banda de peso molecular más bajo, que correspondía al alelo "G", y la banda de peso molecular más alto, que correspondía al alelo "A". El template de ADN aislado del plasma de una hembra embarazada contiene template de ADN materno y template de ADN fetal.

Como se ve en la FIG. 20, línea 1, el template de ADN materno era homocigótico para adenina en este SNP (compare líneas 1 y 2). El alelo "G" representaba el ADN fetal. Las señales del template de ADN materno y el template de ADN fetal se ha distinguido claramente. El alelo "G" se convierte en una señal para el ADN fetal, y se pued usar para medir la cantidad de ADN fetal presente en la muestra. Adicionalmente, una vez se

ha determinado el porcentaje de ADN fetal en el plasma materno de una muestra dada, cualquier desviación de este porcentaje indica una anomalía cromosómica. Este método provee el primer método no invasivo para la detección de anomalías cromosómicas fetales.

Como se ve en la FIG. 20, línea 3, el análisis de ADN materno para SNP TSC0418134 generó una banda simple que migró en la posición esperada de una banda de peso molecular más alto, que correspondía al alelo adenina. Asimismo, el análisis de template de ADN multiplexado aislado del plasma materno produjo una banda simple, que migró a la posición esperada del alelo adenina (ver FIG. 20, línea 4). Ambos, el ADN materno y el ADN fetal son homocigóticos para adenina en TSC0418134.

A continuación se ilustra un esquema de proyección 5' para TSC0129188, en donde R indica el sitio variable

10/14	5' TCAT				
	3' AGTA	R	A	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

El nucleótido aguas arriba del sitio variable (R) no corresponde a guanina en la dirección de la cadena. Así, la proyección 5' generada por las propiedades de corte 11/15 de BsmF I será llenada idénticamente a la proyección 5' generada por el corte 10/14. Se usó ddGTP marcado en presencia de dATP, dTTP y dCTP no marcados para la reacción de llenado. Las moléculas de ADN generados después de la reacción de llenado se ilustran como sigue:

Alelo A 10/14	5' TCAT	A	T	G*	
	3' AGTA	T	A	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo G 10/14	5' TCAT	G*			
	3' AGTA	C	A	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

El análisis del ADN materno para SNP TSC0129188 produjo una banda simple que correspondía a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección, que representaba al alelo "G" (ver FIG. 20, línea 5). No se detectó banda para el alelo de adenina, que indicó que el ADN materno es homocigótico para guanina.

En contraste, el análisis del template de ADN multiplexado del plasma materno, que contenía tanto ADN materno como ADN fetal, produjo dos bandas distintas (ver FIG. 20, línea 6). La banda de más bajo peso molecular correspondía al alelo "G", mientras que la de más alto peso molecular correspondía al alelo "A". El alelo "A" representa el ADN fetal. Así, se ha desarrollado un método que permite la separación de las señales de ADN materno y ADN fetal sin la complejidad adicional de tener que aislar las células fetales. Además, no se requiere una muestra de ADN paterno para detectar las diferencias entre el ADN materno y el ADN fetal.

El análisis del ADN materno para SNP TSC0501389 produjo una banda simple que migró a la posición de peso molecular más alto, que corresponde al alelo "A". No se detectó banda que correspondiera al alelo "G". De igual manera, el análisis del template de ADN multiplexado del plasma materno para SNP TSC0501389 produjo una banda simple que migró a la posición de peso molecular más alto, que correspondía al alelo "A". Ambos, template de ADN materno y template de ADN fetal eran homocigóticos para adenina en SNP TSC0501389.

El ADN materno y el ADN del plasma se originaron de la misma muestra. Una muestra que fue obtenida a través de un procedimiento no invasivo, que proveyó una huella dactilar tanto para la madre como para el feto.

De los veintinueve SNPs para los cuales el template de ADN materno era homocigótico, el template de ADN fetal era heterocigótico en dos de los veintinueve SNPs. El ADN fetal era homocigótico para el mismo alelo que el ADN materno en los 27 SNPs restantes (los datos no se muestran). La comparación de los alelos homocigóticos del template de ADN materno y el template de ADN del plasma en un SNP dado proveen un nivel agregado de control de calidad. No es posible que el template de ADN materno y el

templete de ADN del plasma sean homocigóticos para alelos diferentes en el mismo SNP. Si esto se ve, indicaría que ha ocurrido un error en el procesamiento.

Los métodos descritos aquí demuestran que la señal genética materna se puede separar y distinguir de la señal genética fetal en una muestra de plasma materno. El ejemplo anterior analizó SNPs localizados en el cromosoma 13, sin embargo se puede analizar cualquier cromosoma incluyendo el cromosoma humano 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X y Y, y cromosomas fetales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X y Y.

Adicionalmente, los métodos descritos aquí se pueden usar para detectar ADN fetal en cualquier muestra biológica que incluye, sin limitarse a célula, tejido, sangre, suero, plasma, saliva, orina, lágrimas, secreciones vaginales, sangre del cordón umbilical, velloidad coriónica, fluido amniótico, tejidos embrionicos, fluido linfático, fluido cerebroespinal, secreciones mucosas, fluido peritoneal, materia fecal o transpiraciones corporales.

Los métodos descritos aquí demuestran que el porcentaje de ADN fetal en la muestra materna se puede determinar mediante el análisis de SNPs, en donde el ADN materno es homocigótico, y el ADN aislado del plasma de la hembra embarazada es heterocigótico. El porcentaje de ADN fetal se puede usar para determinar si el genotipo fetal tiene desordenes cromosómicos.

Por ejemplo, si se calcula que el porcentaje de ADN fetal presente en la muestra es del 30% por el análisis del cromosoma 1 (anormalidades cromosómicas que involucran el cromosoma 1 interrumpen el embarazo tempranamente), entonces cualquier desviación del ADN fetal del 30% es indicativa de una anomalía cromosómica. Por ejemplo, si al analizar un SNP o múltiples SNPs en el cromosoma 18, el porcentaje de ADN fetal es más alto del 30%, esto indicaría que está presente una copia adicional del cromosoma 18. El porcentaje calculado de ADN fetal de cualquier cromosoma se puede comparar con cualquier otro cromosoma. En particular, el porcentaje de ADN fetal en el cromosoma 13 se puede comparar al porcentaje de ADN fetal en los cromosomas 18 y 21.

Este análisis es asistido por el conocimiento de la relación esperada de un alelo a otro alelo en cada SNP. Como se discutió en el Ejemplo 9, no todos los SNPs heterocigóticos muestran relación de 50:50. El conocimiento de la relación esperada de un alelo a otro alelo reduce el número global de sitios variables que deben ser analizados. Sin embargo, incluso sin el conocimiento de las relaciones esperadas para los SNPs, el porcentaje de ADN fetal se puede calcular mediante el análisis de un gran número de SNPs. Cuando el tamaño de muestreo de SNPs es lo suficientemente grande, se eliminará la variación estadística que surge de los valores de relaciones esperadas.

Además, los SNPs maternos heterocigóticos también proveen información valiosa. El análisis no está limitado a SNPs maternos homocigóticos. Por ejemplo, si en un SNP heterocigótico en el ADN materno, la relación de alelo 1 a alelo 2 es 1:1, entonces en el Template de ADN del plasma, la relación debe permanecer 1:1 a menos que el ADN fetal porte una anomalía cromosómica.

Los métodos anteriores también se pueden usar para detectar mutaciones en el ADN fetal que incluyen, sin limitarse a mutaciones puntuales, transiciones, transversiones, translocaciones, inserciones, eliminaciones y duplicaciones. Como se muestra en la FIG. 20, el ADN fetal se puede distinguir fácilmente del ADN materno. Los métodos anteriores se pueden usar para determinar la secuencia de cualquier sitio de interés para cualquier gen.

Habiendo descrito la invención totalmente, los expertos entenderán que la invención se puede llevar a cabo en un amplia y equivalente rango de condiciones, parámetros y similares, sin afectar el espíritu del alcance de la invención o cualquier realización de esta.

Todos los documentos, e.g., publicaciones científicas, patentes o publicaciones de patentes citadas aquí, están incorporados en su totalidad a esta como referencia, en la misma extensión que si cada documento individual estuviera específica e individualmente indicado como incorporado para referencia en su totalidad. Cuando el documento citado solo provee la

primera página del documento, se entiende que es el documento entero, incluyendo las páginas restantes del documento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de una anomalía cromosómica, dicho método comprende:

(a) determinación de la secuencia de alelos de un sitio de interés del template de ADN

(b) cuantificación de la cantidad relativa de los alelos en un sitio de interés heterocigótico que fue identificado del sitio de interés de (a), en donde dicha cantidad relativa se expresa como una relación, en donde dicha relación indica la presencia o ausencia de una anomalía cromosómica.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho template de ADN se obtiene de una fuente seleccionada del grupo consistente de humano, no humano, mamífero, reptil, ganado, gato, perro, cabra, cerdo, marrano, mico, simio, gorila, toro, vaca, oso, caballo, oveja, ave, ratón, rata, pez, delfín, ballena y tiburón.

3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el template de ADN es obtenido de una muestra seleccionada del grupo consistente de: una célula, célula fetal, tejido, sangre, suero, plasma, saliva, orina, lágrima, secreción vaginal, sangre del cordón umbilical, vellocidad coriónica, fluido amniótico, tejido embrionario, un embrión, un embrión de cuatro células, un embrión de ocho células, un embrión de 16 células, un embrión de 32 células, un embrión de 64 células, un embrión de 128 células, un embrión de 256 células, un embrión de 512 células, un embrión de 1024 células, fluido linfático, fluido cerebroespinal, secreción mucosa, fluido peritoneal, fluido ascítico, material fecal o transpiración corporal, y en donde opcionalmente, dicha muestra está mezclada con un inhibidor de lisis de célula.

4. El método de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los alelos de múltiples sitios de interés están secuenciados, y sus relativas cantidades están cuantificadas y expresadas como una relación.

5. El método de la reivindicación 4, en donde dichos múltiples sitios de interés están en múltiples cromosomas.

6. El método de la reivindicación 2 o 3, en donde dicho ADN es obtenido de una muestra de una hembra embarazada.

7. El método de las reivindicaciones 3 a 6, en donde dicho inhibidor de lisis de célula es seleccionado del grupo consistente de glutaraldehído, derivados de glutaraldehído, formaldehído, formalina y derivados de formaldehído.

8. El método de la reivindicación 7, en donde dicha muestra es sangre de una hembra embarazada.

9. El método de la reivindicación 8, en donde dicha sangre es obtenida de una hembra embarazada, cuando el feto está en una edad gestacional seleccionada del grupo consistente de: 0-4, 4-8, 8-12, 12-16, 16-20, 20-24, 24-28, 28-32, 32-36, 36-40, 40-44, 44-48, 48-52, y más de 52 semanas.

10. El método de las reivindicaciones 3 a 9, en donde dicho template de ADN comprende una mezcla de ADN materno y ADN fetal.

11. El método de la reivindicación 10, en donde antes de (a), el ADN materno es secuenciado para identificar un sitio de interés homocigótico o heterocigótico, y además en donde dicho sitio de interés homocigótico o heterocigótico es el sitio de interés analizado en el template de ADN de (a).

12. El método de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la determinación de la secuencia de alelos comprende:

(a) amplificación de alelos de un sitio de interés en el template de ADN usando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción de forma que la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés.

(b) digestión del ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla;

(c) incorporación de un nucleótido en el ADN digerido de (b) mediante el uso de la proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template; y

(d) determinación de la secuencia de alelos del sitio de interés, mediante la determinación de la secuencia de ADN de (c).

13. El método de la reivindicación 12, en donde dichas primera y segunda plantillas contienen una porción de un sitio de reconocimiento de enzima de restricción que contiene un nucleótido variable, en donde el sitio total de reconocimiento de enzima de restricción se genera después de la amplificación.

14. El método de la reivindicación 13, en donde el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción es para una enzima de restricción seleccionada del grupo consistente en BsaJ I, Bsk I, Dde I, EcoN I, Fnu4H I, Hinf I y ScrF I.

15. El método de la reivindicación 12, en donde la enzima de restricción corta al ADN a una distancia del sitio de reconocimiento.

16. El método de la reivindicación 15, en donde el sitio de reconocimiento es para una enzima de restricción tipo IIS.

17. El método de la reivindicación 16, en donde la enzima de restricción tipo IIS es seleccionada del grupo consistente en Alw I, Alw26 I, Bbs I, Bbv I, BceA I, Bmr I, Bsa I, Bst71 I, BsmA I, BsmB I, BsmF I, BspM I, Ear I, Fau I, Fok I, Hga I, Ple I, Sap I, SSfaN I y Sthi32 I.

18. El método de la reivindicación 12, en donde dicho método de amplificación es seleccionado del grupo consistente de: reacción en cadena de polimerasa, reacción de secuencia auto-soportada, reacción en cadena de ligasa, amplificación rápida de extremos cADN, reacción en cadena de polimerasa y reacción en cadena de ligasa, amplificación de Q-beta fago, amplificación de desplazamiento de cadena y empalme de superposición por extensión de reacción en cadena de polimerasa.

19. El método de la reivindicación 18, en donde una temperatura de recocido para el ciclo 1 de la reacción en cadena de polimerasa está cerca de la temperatura de fusión de la porción de la región 3' de la segunda plantilla que se recoce al template de ADN.

20. El método de la reivindicación 19, en donde una temperatura de recocido para el ciclo 2 de la reacción en cadena de polimerasa está cerca de la temperatura de fusión de la porción de la región 3' de la primera plantilla que se recoce al template de ADN.

21. El método de la reivindicación 20, en donde una temperatura de recocido para los ciclos restantes de la reacción en cadena de polimerasa está cerca de la temperatura de fusión de la segunda plantilla entera.

22. El método de las reivindicaciones 1 a 21, en donde la determinación de la secuencia comprende un método seleccionado del grupo consistente de: PCR de alelo específico, espectrometría de masas, hibridación, extensión de la plantilla, detección de fluorescencia, transferencia de energía de resonancia con fluorescencia (FRET), secuenciamiento, secuenciamiento dideoxi de Sanger, microformación de ADN, manchas al sur, manchas en canal, manchas punteadas, y espectrometría de masas MALDI-TOF.

23. El método de las reivindicaciones 1 a 22, en donde dicha relación de alelos en sitios de interés heterocigóticos en un cromosoma es sumada y comparada con la relación de alelos en sitios de interés heterocigóticos de un cromosoma diferente, en donde una diferencia de relaciones indica la presencia de una anomalía cromosómica.

24. El método de la reivindicación 23, en donde los cromosomas que son comparados son cromosomas humanos seleccionados del grupo consistente de: cromosoma 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X y Y.

25. El método de la reivindicación 23, en donde se compara la relación de alelos en sitios de interés heterocigóticos de los cromosomas 13, 18 y 21.

26. El método de la reivindicación 1, en donde dicho sitio de interés es un polimorfismo de nucleótido simple o una mutación.

27. Un método para determinar la secuencia de un sitio de interés en ADN fetal, dicho método comprende:

(a) obtención de una muestra de una hembra embarazada a la cual se le ha agregado un inhibidor de lisis de célula; y

(b) determinación de la secuencia de un sitio de interés en el template de ADN de dicha muestra de (a), en donde dicho template de ADN comprende ADN fetal y ADN materno.

28. El método de la reivindicación 27, en donde dicha muestra de hembra embarazada es seleccionada del grupo consistente de: tejido, célula, sangre, suero, plasma, orina y secreción vaginal.

29. El método de la reivindicación 27 o 28, en donde dicho inhibidor de lisis de célula es seleccionado del grupo consistente de: glutaraldehído, derivados de glutaraldehído, formaldehído, derivados de formaldehído y formalina.

30. El método de la reivindicación 27 o 28, en donde antes del paso (b), el template de ADN es aislado.

31. El método de la reivindicación 27 o 28, en donde antes del paso (b) se determina la secuencia de la secuencia del sitio de interés en el template de ADN materno o paterno.

32. El método de las reivindicaciones 27 a 31, en donde dicho sitio de interés es un polimorfismo de nucleótido simple o una mutación.

33. El método de las reivindicaciones 27 a 32, en donde se determina la secuencia de múltiples sitios de interés.

34. El método de la reivindicación 33, en donde los múltiples sitios de interés están en múltiples cromosomas.

35. El método de las reivindicaciones 27 a 34, en donde la determinación de secuencias comprende:

(a) amplificación de un sitio de interés en un template de ADN usando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, de forma que la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés;

(b) digestión del ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla;

(c) incorporación de un nucleótido en el ADN digerido de (b) mediante el uso de una proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template; y

(d) determinación de la secuencia de un sitio de interés mediante la determinación de la secuencia del ADN de (c).

36. El método de la reivindicación 35, en donde dichas primera y segunda plantillas contienen una porción de un sitio de reconocimiento de enzima de restricción que contiene un nucleótido variable, en donde el sitio completo de reconocimiento de enzima de restricción se genera después de la amplificación.

37. El método de la reivindicación 36, en donde la enzima de restricción es seleccionada de un grupo consistente de BsaJ I, Bssk I, Dde I, EcoN I, Fnu4H I y ScrF I.

38. El método de la reivindicación 35, en donde la enzima de restricción corta el ADN a una distancia del sitio de reconocimiento.

39. El método de la reivindicación 38, en donde el sitio de reconocimiento es para una enzima de restricción Tipo IIS.

40. El método de la reivindicación 39, en donde la enzima de restricción tipo IIS es seleccionada del grupo consistente de: Alw I, Alw26 I, Bbs I, Bbv I,

BceA I, Bmr I, Bsa I, Bst71 I, BsmA I, BsmB I, BsmF I, BspM I, Ear I, Fau I, Fok I, Hga I, Ple I, Sap I, SSfaN I y Sthi32 I.

41. El método de la reivindicación 35, en donde dicho método de amplificación es seleccionado del grupo consistente de: reacción en cadena de polimerasa, reacción de secuencia auto-soportada, reacción en cadena de ligasa, amplificación rápida de extremos cADN, reacción en cadena de polimerasa y reacción en cadena de ligasa, amplificación de Q-beta fago, amplificación de desplazamiento de cadena y empalme de superposición por extensión de reacción en cadena de polimerasa.

42. El método de la reivindicación 41, en donde una temperatura de recocido para el ciclo 1 de la reacción en cadena de polimerasa está cerca de la temperatura de fusión de la porción de la región 3' de la segunda plantilla que se recoce al template de ADN.

43. El método de la reivindicación 42, en donde una temperatura de recocido para el ciclo 2 de la reacción en cadena de polimerasa está cerca de la temperatura de fusión de la porción de la región 3' de la primera plantilla que se recoce al template de ADN.

44. El método de la reivindicación 43, en donde una temperatura de recocido para los ciclos restantes de la reacción en cadena de polimerasa está cerca de la temperatura de fusión de la segunda plantilla entera.

45. El método de la reivindicación 35, en donde la secuencia de un sitio de interés se determina usando un método seleccionado del grupo consistente de: PCR de alelo específico, espectrometría de masas, hibridación, extensión de la plantilla, polarización de fluorescencia, transferencia de energía de resonancia con fluorescencia (FRET), detección de fluorescencia, secuenciamiento, secuenciamiento dideoxi de Sanger, microformación de ADN, manchas al sur, manchas en canal, manchas punteadas y espectrometría de masas MALDI-TOF.

46. Un método para determinar la secuencia de un sitio de interés en ADN fetal, dicho método comprende:

(a) amplificación de un sitio de interés en un template de ADN usando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, de forma que la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés;

(b) digestión del ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla;

(c) incorporación de un nucleótido en el ADN digerido de (b) mediante el uso de una proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template; y

(d) determinación de la secuencia de un sitio de interés mediante la determinación de la secuencia del ADN de (c).

47. El método de la reivindicación 46, que comprende adicionalmente la obtención de template de ADN de una muestra de una hembra embarazada, a la que se le ha agregado un inhibidor de lisis de célula, y en donde dicho template de ADN comprende ADN fetal y ADN materno.

48. El método de la reivindicación 47, en donde dicha muestra de hembra embarazada es seleccionada del grupo consistente de: tejido, célula, sangre, suero, plasma, orina y secreción vaginal.

49. El método de la reivindicación 47, en donde dicho inhibidor de lisis de célula es seleccionado del grupo consistente de: glutaraldehído, derivados de glutaraldehído, formaldehído, derivados de formaldehído y formalina.

50. Un kit para uso en cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1 a 49 que comprende un juego de plantillas usadas en el método, en donde la segunda plantilla contiene una secuencia que genera un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, de forma que la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés, y un set de instrucciones.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION ☒ **MODELO DE UTILIDAD** ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒ 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒ 1
- ◆ Descripción de la invención ☒ 17
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒ 2

COMPLETA ☒ **INCOMPLETA** ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐ **INCOMPLETA** ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐ **INCOMPLETA** ☐

Firma Responsable

Fecha

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

2020

Bogotá D C

313

Doctor(a)
ALICIA LLOREDA RICAURTE
Apoderado
ravgen

Oficio N° **10048**

ASUNTO:

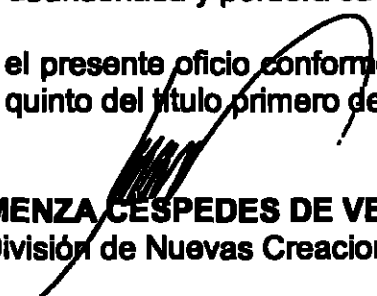
Radicación N°	04-97189
Solicitud internacional	PCT/US03/06198
Fecha inicio fase nacional	2004-10-01
Trámite	011
Evento	379
Actuación	430
Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486).
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando éste fuere una persona jurídica.
- En caso que se presenten anexos al examen preliminar, estos deben ser anexados junto con su respectiva traducción.. (Art. 36.2.b) del tratado PCT).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,

202063 29 OCT. 2004

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia